

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS

MEDICINOS AKADEMIJA

FARMACIJOS FAKULTETAS  
VAISTŲ CHEMIJOS KATEDRA

JONAS SALYS

***HIPOKSIJOS POVEIKIS ADENOSINO RECEPTORIŲ GENŲ RAIŠKAI  
ŽIURKĖS PLAUČIŲ KRAUJAGYSLIŲ ENDOTELIO LĄSTELĖSE IR  
ADENOSINO RECEPTORIŲ AGONISTŲ POVEIKIS LĄSTELIŲ  
PROLIFERACIJAI***

**Magistro baigiamasis darbas**

**Darbo vadovai**

Prof. dr. Laima Tarasevičienė – Stewart

Prof. dr. Hiliaras Rodovičius

**Konsultantė**

Dr. Adelheid Kratzer

Denveris

Kaunas, 2013

LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS  
MEDICINOS AKADEMIJA

FARMACIJOS FAKULTETAS  
VAISTŲ CHEMIJOS KATEDRA

**TVIRTINU:**

Farmacijos fakulteto dekanas prof. dr. Vitalis Briedis

***HIPOKSIJOS POVEIKIS ADENOZINO RECEPTORIŲ GENŲ RAIŠKAI  
ŽIURKĖS PLAUČIŲ KRAUJAGYSLIŲ ENDOTELIO LĄSTELĖSE IR  
ADENOZINO RECEPTORIŲ AGONISTŲ POVEIKIS LĄSTELIŲ  
PROLIFERACIJAI***

**Magistro baigiamasis darbas**

Konsultantė:

Dr. Adelheid Kratzer

Darbo vadovai:

Prof. dr. Laima Tarasevičienė – Stewart

Prof. dr. Hiliaras Rodovičius

Recenzentė

Prof. dr. Dalė Vieželiene

Darbą atliko

Magistrantas Jonas Salys

Denveris

Kaunas, 2013

## TURINYS

SANTRAUKA .....	5
SUMMARY .....	6
1. SANTRUMPOS.....	7
2. ĮVADAS.....	9
3. LITERATŪROS APŽVALGA.....	10
3.1 Su G baltymu susiję receptoriai.....	10
3.2 Adenozino receptoriai .....	11
3.2.1. A1 receptorius .....	11
3.2.2. A2A receptorius .....	12
3.2.3. A2B receptorius.....	13
3.2.4. A3 receptorius .....	14
3.3 Adenozino receptorių agonistai .....	15
3.3.1. Adenozinas .....	15
3.3.2. A1 receptoriaus agonistai .....	16
3.3.3. A2A receptoriaus agonistai .....	17
3.3.4. A2B receptoriaus agonistai .....	18
3.3.4. A3 receptoriaus agonistai .....	19
3.4. Adenozino receptorių antagonistai .....	20
3.4.1. A1 receptoriaus antagonistai .....	20
3.4.2. A2A receptoriaus antagonistai .....	21
3.4.3. A2B receptoriaus antagonistai .....	22
3.4.4. A3 receptoriaus antagonistai .....	23
3.5. Plaučių arterijos ir plaučių smulkių kraujagyslių endotelio ląstelės .....	23
3.5.1. Hipoksijos poveikis plaučių endotelio ląstelėms .....	24
4. TYRIMŲ OBJEKTAS IR METODAI .....	25
4.1. RNR išskyrimas.....	25
4.2. RNR kokybės kontrolė .....	26
4.3. <i>In vitro</i> DNR sintezė naudojant RNR matricą.....	26
4.4. Imunohistocheminis tyrimas .....	27
4.5. Kiekybinė tikro laiko polimerazės grandininė reakcija.....	27
4.6. Ląstelių kultūra.....	29
4.7. Ląstelių skaičiaus ir gyvybingumo įvertinimas.....	29

4.8. Žiurkių paveikimas hipoksija ir plaučių preparavimas .....	29
4.9. Statistinė analizė.....	30
4.10. Ląstelių proliferacijos įvertinimas.....	30
5. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS .....	30
5.1. Adenozino receptorių genų raiška plaučių endotelio ląstelėse .....	31
5.2. Adenozino receptorių genų raiškos pokyčiai plaučių endotelio ląstelėse esant hipoksijai .....	33
5.3. Adenozino receptorių agonistų įtaka plaučių endotelio ląstelių proliferacijai .....	37
5.4. Adenozino receptorių genų raiškos pokyčiai žiurkių plaučiuose, esant hipoksinėms sąlygomis .....	40
5.5. A3R raiška PAH pacientų plaučiuose .....	43
6. IŠVADOS .....	45
7. REKOMENDACIJOS .....	45
8. LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	46

## SANTRAUKA

Lietuvos Sveikatos Mokslų Universiteto (LSMU), farmacijos fakulteto, V kurso, 1-mos grupės studento, Jono Salio magistro baigiamasis darbas: „Hipoksijos poveikis adenozino receptorių genų raiškai žiurkės plaučių kraujagyslių endotelio ląstelėse ir adenozino receptorių agonistų poveikis ląstelių proliferacijai“. Moksliniai vadovai: Prof. dr. Hiliaras Rodovičius LSMU, Farmacijos Fakulteto, Vaistų Chemijos Katedra – Kaunas. Prof. dr. Laima Tarasevičienė – Stewart, Kolorado Universiteto, Medicinos Fakulteto, Pulmonologijos Mokslų ir Intensyvios Terapijos Skyrius - Denveris.

**Raktiniai žodžiai:** adenozino receptoriai, plaučių endotelio ląstelės, hipoksija.

**Darbo tikslas:** Nustatyti adenozino receptorių (AR) genų raišką (informacinės RNR lygyje) plaučių kraujagyslių endotelio ląstelėse ir žiurkės plaučiuose, jų pokyčius esant hipoksijai, įvertinti AR poveikį endotelio ląstelių proliferacijai.

**Darbo uždaviniai:** 1) Ištirti žiurkės plaučių smulkių kraujagyslių endotelio (PSKE) ir žiurkės plaučių arterijos endotelio (PAE) AR genų raišką, veikiant hipoksijai. 2) Nustatyti AR agonistų poveikį PSKE ląstelių proliferacijai. 3) Nustatyti AR genų raiškos pokyčius žiurkės plaučiuose esant hipoksijai. 4) Nustatyti adenozino receptorių A3 (A3R) pasiskirstymą plaučių arterinės hipertenzijos (PAH) paciento plaučių mėginyje, taikant imunohistocheminį tyrimą.

**Darbo metodai:** genų raiška nustatyta taikant kiekybinę tikro laiko polimerazės grandininę reakciją (KTL-PGR) naudojant “Taqman®” pradmenis ir zondus adenozino receptoriams. Ląstelių proliferacija įvertinta tričiu žymėto timidino (<sup>3</sup>H-timidino) įjungimu į ląstelių DNR. A3R pasiskirstymas PAH paciento plaučiuose įvertinamas, taikant imunohistocheminį tyrimą.

**Tyrimo rezultatai:** PSKE ląstelėse rasta adenozino receptorių A2B ir A3R. Hipoksijos aplinkoje A2BR genų raiška padidėjo 1,9 kartus po 24 val., 5,3 karto po 40 val. A3R genų raiška sumažėjo 1,8 karto po 24 val., 6,2 karto po 40 valandų. PAE ląstelėse rasta AR: A1, A2AR ir A2BR. Hipoksijos aplinkoje A1R genų raiška padidėjo 2,5 karto po 40 val. A2AR genų raiška padidėjo 1,9 karto po 24 val., o po 40 val 2,2 karto. A2BR genų raiška padidėjo 2,7 karto po 24 val., išliko 2,7 karto padidėjusi po 40 val. Paveikus PSKE ląsteles A3R agonistu HEMADO 10<sup>-7</sup> M koncentracija, proliferacija padidėjo 1,5 karto. Veikiant ląsteles AR agonistu NECA 10<sup>-8</sup> M koncentracija, proliferacija padidėjo 1,5 karto. Esant hipoksijai žiurkės plaučių A1R genų raiška padidėjo 2,5 karto po 3 d., 3,1 karto po 7 d. ir 2,1 karto po 21 d.

**Išvados :** AR genų raiška PSKE ir PAE ląstelėse skiriasi. Hipoksija padidina daugelio AR genų raišką endotelio ląstelėse, išskyrus A3R. Hipoksija padidina A1R genų raišką žiurkės plaučiuose, esant hipoksijai. Imunohistocheminių tyrimų metu A3R aptinkamas plaučių kraujagyslių okliuzijos vietose.

## SUMMARY

Master thesis of Lithuanian University of Health Science (LHSU), School of Pharmacy, 5<sup>th</sup> year, 1<sup>st</sup> group student Jonas Salys: “Hypoxia effects of adenosine receptors expression in rat pulmonary endothelial cells and influence of adenosine receptors agonists to endothelial cell proliferation”. Mentors: prof. dr. Hiliaras Rodovičius – LHSU, School of Pharmacy, Department of Drug Chemistry– Kaunas, Prof. dr. Laima Tarasevičienė - University of Colorado Denver, School of Medicine, Pulmonary Sciences and Critical Care Medicine – Denver, Colorado USA.

**Keywords:** adenosine receptors, pulmonary endothelial cells, cell proliferation, hypoxia.

**Aims:** Determine adenosine receptors (AR) gene expression in rat pulmonary microvascular endothelial cells (RPMVEC), rat pulmonary artery endothelial cells (RPAEC) and rat lungs during hypoxic conditions. Evaluate effects of adenosine receptors agonist to PRMVEC proliferation.

**Objectives:** 1) Identify AR in RPMVEC and RPAEC. 2) Evaluate AR changes in RPMVEC and RPAEC during hypoxic conditions. 3) Determine adenosine receptors expression in rat lungs exposed to chronic hypoxia. 4) Perform immunohistochemical staining of A3R on a lung section from patient with pulmonary arterial hypertension (PAH).

**Methods:** Adenosine receptors gene expression was determined by quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay using “TaqMan®” primers. Cell proliferation was determined using a tritium labeled thymidine (<sup>3</sup>H-thymidine) assay. Immunohistochemistry was performed on paraffin embedded lung tissue sections.

**Results:** RPMVEC express A2BR and A3R. During hypoxic conditions A2BR was upregulated 1,9-fold after 24 h. and 5,3-fold after 40 h. A3R was downregulated 1,8- fold after 24 h. and 6,2-fold after 40 h. RPAEC express A1R, A2AR and A2BR. During hypoxic conditions A1R expression was increased 2,5-fold after 40h. A2AR was upregulated 1,9-fold after 24h and 2,2-fold after 40h. A2BR expression was increased 2,7-fold after 24 h. and 40 h. of hypoxic exposure. The A3R agonist HEMADO treatment for 24 h. at the concentration of 10<sup>-7</sup> M, increased RPMVEC proliferation 1,5-fold. AR expression of mRNA was also evaluated in the whole lung tissue extract from rats exposed to chronic hypoxia. There was a 2,5-fold increase of A1R expression after 3 days, 3,1-fold after 7 days and 2,1-fold after 21 days if hypoxic exposure. Immunohistochemical staining revealed selective binding of A3R antibody to vascular lesions sites in lung sections from patient with PAH.

**Conclusion:** AR gene expression is different in RPMVEC and RPAEC. Hypoxia upregulated A1R, A2AR and A2BR expression in RPAEC while A3R expression in RPMVEC was downregulated. Hypoxia increases an A1R gene expression in rat lungs. Immunohistochemical staining revealed an A3R expression in vascular lesions from patients with severe PAH.

## 1. SANTRUMPOS

A1R- adenzino receptorius A1  
A2AR- adenzino receptorius A2  
A2BR- adenzino receptorius A2B  
A3R- adenzino receptorius A3  
PSKE- plaučių smulkių kraujagyslių endotelio ląstelės  
PAE- plaučių arterijos endotelio ląstelės  
PAH- plaučių arterinė hipertenzija  
iRNR- informacinė ribonukleorūgštis  
DNR- deoksiribonukleorūgštis  
ADA- adenzino deaminazė  
AR- adenzino receptoriai  
ATP- adenzintrifosfatas  
ADP- adenzindifosfatas  
cAMP- ciklinis adenzino monofosfatas  
AC- adenilataciklazė  
GBSR- Su G baltymu susieti receptoriai  
FVS- fetalinis veršelio serumas  
KTL-PGR- kiekybinė tikro laiko polimerazės grandininė reakcija  
MAPK- mitogenų aktyvuotos baltymų kinazės  
PSVT - paroksizminė supraventrikulinė tachikardija  
NECA- 5'-*N*-etilkarboksiamidoadenzinas neselektyvus adenzino receptorių agonistas  
CPA- *N*-ciklopentiladenozinas selektyvus A1R agonistas  
HEMADO- 2-(1-heksinil-*N*-metiladenozinas) selektyvus A3R agonistas  
CV1808- 2-fenilaminoadenozinas selektyvus A2AR ir A2BR agonistas  
SPM- nustatytas beta dalelių skaičius per minutę  
V/V – veikimo vienetai  
PBS - fosfatinio buferio druskų tirpalas

## **PADĖKA**

Dėkoju prof. habil. dr. Eduardui Tarasevičiui už pagalbą rengiant darbą.

Dėkoju prof. dr. Evgenia Gerasimovskaya už pagalbą vykdant ląstelių proliferacijos eksperimentus.

Dėkoju doc. dr. Birutei Briaukienei už pagalbą lietuvių terminologijos klausimais.

Dėkoju konsultantei dr. Adelheid Kratzer už išsamias konsultacijas.

Dėkoju recenzentei prof. dr. Dalei Vieželienei už darbo recenzavimą.

Dėkoju Justinai Liausaitei už kirtišką darbo skaitymą.

Ypatingai dėkoju darbo vadovams prof. dr. Laimai Tarasevičienei- Stewart ir prof. dr. Hiliarui Rodovičiui už galimybę atlikti ir parengti magistrinį baigiamąjį darbą.



## 2. ĮVADAS

Adenozinas - purino nukleozidas, kuris dalyvauja daugelyje žmogaus biocheminių procesų. Be to, jis yra daugelio molekulių pagrindas, pvz.: adenozino trifosfato (ATP), adenozino difosfato (ADP) ir kt. Farmakologiniu požiūriu adenozinui būdingas skirtingas giminingumas ir gebėjimas aktyvuoti keturis adenozino receptorius (AR). Adenozino receptoriai yra susijungę su skirtingais G-baltymais. Fiziologinis adenozino receptorių efektas ir signalo perdavimas priklauso nuo G-baltymo tipo.

Adenozinas ilgą laiką buvo žinomas kaip vazodilatatorius. Šis purino nukleozidas vartojamas diagnostikai ir terapijai, gydant paroksizminę supraventrikulinę tachikardiją (PSVT) [1-3]. Remiantis adenozino vazodilatacinėmis savybėmis, atlikti klinikiniai tyrimai, kuriuose nustatyta galima naudoti gydant plaučių arterinę hipertenziją (PAH). Pastebėtas statistiškai patikimas plaučių kraujagyslių pasipriešinimo sumažėjimas ir minimalūs pokyčiai sisteminiai kraujotakai. Kadangi adenozino skilimo pusperiodis yra labai trumpas, teigiami rezultatai skatina susidomėjimą naujų ilgo veikimo adenozino analogų kūrimu bei jų terapiniu pritaikymu [4-6]. Atlikti tyrimai rodo, kad adenozino signalų perdavimo mechanizmai gali būti pakitę sergant plaučių arterine hipertenzija. Taip pat manoma, kad adenozino signalų perdavimo būdai dalyvauja ligos patogenezėje [7, 8]. Neaišku, ar adenozino signalo perdavimo pokyčiai yra PAH ligos priežastis. Remiantis atliktų tyrimų duomenimis pastebėta, kad adenozino koncentracija kraujyje yra mažesnė sergančiųjų PAH [9].

PAH kraujagyslių disfunkcija yra susijusi su lygiųjų raumenų ląstelių proliferacijos pokyčiais, tačiau negalima atmesti endotelio ląstelių vaidmens ligos patogenezėje. PAH pacientų plaučių kraujagyslių pažaidos vietose matomas arterijų spindžio susiaurėjimas dėl endotelio hiperproliferacijos [10].

Remiantis tyrimų duomenimis pastebėta, kad plaučių arterijos endotelio ląstelės (PAE) ir plaučių smulkiųjų kraujagyslių endotelio (PSKE) ląstelės skiriasi, tačiau skirtumų tarp šių ląstelių tipų atsižvelgiant į adenozino receptorių pokyčius nenustatyta nei genų raiškos, nei baltymų lygiu. Šis darbas skirtas nustatyti adenozino receptorių genų raišką (iRNR lygiu) skirtingose plaučių endotelio ląstelėse, jų pokyčius esant hipoksijai ir endotelio ląstelių proliferacijos pokyčius veikiant specifiniais AR agonistais. Taip pat nustatyti AR genų raiškos pokyčius žiurkių plaučiuose, esant hipoksijai. Genų raiškos pokyčiams nustatyti pasirinkta kiekybinė tikro laiko polimerazės grandininė reakcija (KTL-PGR) naudojant „TaqMan®“ pradmenis ir zondus. Pasirinkta genų raiškos nustatymo sistema pasižymi specifiskumu ir tikslumu lyginant su ilgą laiką naudota SYBR žaliąjo dažo sistema [11]. Nustačius AR genų raiškos pokyčius (iRNR transkriptų lygyje) žiurkės plaučių endotelio ląstelėse ir

žiurkių plaučiuose, galima toliau tirti AR pokyčius baltymo lygiu. Taip pat tirti receptorių veikimo mechanizmus bei galimą vaidmenį PAH ligos patogenezėi.

**Darbo tikslas:** Nustatyti adenosino receptorių genų raišką (iRNR lygiu) žiurkės plaučių kraujagyslių endotelio ląstelėse ir žiurkės plaučiuose, jų pokyčius esant hipoksijai, įvertinti AR poveikį endotelio ląstelių proliferacijai.

**Uždaviniai:**

1. Nustatyti AR genų raišką PSKE ir PAE ląstelėse.
2. Nustatyti AR genų raišką PSKE ir PAE ląstelėse hipoksijos metu.
3. Nustatyti AR agonistų įtaką PSKE ląstelių proliferacijai.
4. Nustatyti AR genų raišką žiurkės plaučiuose hipoksijos metu.
5. Atlikti imunohistocheminį tyrimą PAH paciento plaučių mėginiui.

### 3. LITERATŪROS APŽVALGA

#### 3.1. Su G-baltymu susieti receptoriai

Su G baltymu susieti receptoriai (GBSR) yra didžiausia membraninių baltymų šeima žmogaus genome, tai turtingiausias vaistų taikinių šaltinis vaistų kūrėjams. Ligandus šiems receptoriams sudaro kvapai, feromonai, šviesai jautrūs junginiai, hormonai, neurotransmiteriai ir kt. Ligandų dydis gali skirtis nuo mažos molekulinės masės junginių iki peptidų ar baltymų [12]. GBSR yra susiję su daugeliu ligų. Manoma, kad apie 50-60% dabartinių vaistų veikia GBSR [13]. Dėl didelio receptorių skaičiaus daugeliui GBSR ligandai ir funkcija dar nenustatyti.

Receptorius idėja kilo XIXa. pradžioje Paului Erlichui, kuris pasiūlė gretutinės grandinės teoriją (*Corpora non agunt nisi fixata* (vaistai neveikia, jei jie neprisijungia)). Šiuo teiginiu jis bandė paaiškinti antigenų jungimąsi prie ląstelių. 1905 metais John Langley ir jo studentas Thomas Elliot tirdami simpatinį nervinių impulsų perdavimą, sukūrė imlios medžiagos (*angl.* receptive substance) teoriją. Po 6 metų Earl Sutherland atrando ciklinį adenosino monofosfatą (cAMP) ir adenilciklazę (AC). cAMP atradimas labai svarbus žingsnis, atrandant GBSR, nes cAMP yra vienas iš pagrindinių signalo nešiklių. Vykdamas tolimesnius tyrimus buvo pastebėta, kad hormonų receptoriai aktyvuoja AC. Vykdamas tolimesnius tyrimus Alfred G. Gilman ir Martin Rodbell tyrėjų grupės suformuoja G baltymo veikimo principą. 1986 metais, atsiradus rekombinantinės DNR technologijoms, Robert Lefkowitz klonavo pirmąjį GBSR [14]. 1987 metais buvo nustatyta beta 2 adrenerginio receptoriaus baltymo

seka [15]. Tolesnis darbas nustatant tikslesnę struktūrą ir transmembraninius domenus, buvo atliktas Richard Dixon, Brian Kobilka ir kitų grupių [16]. 2012 metais Robert Leftkowitz ir Brian Kobilka buvo nominuoti Nobelio premijai už savo darbus GBSR srityje [17]. Adenozino receptoriai taip pat priklauso GBSR ir atlieka svarbų vaidmenį žmogaus biocheminiuose procesuose.

## 3.2 Adenozino receptoriai

Fiziologinis adenozino efektas buvo pastebėtas maždaug prieš 80 metų, tiriant gyvūnų audinių ekstraktus. Injekavus šiuos ekstraktus laboratoriniams gyvūnams pastebėti širdies ritmo sutrikimai [18]. Tolimesniais tyrimais nustatyta, kad veiklioji medžiaga ekstraktuose - adenozinas. Analizuojant adenozino ir jo inhibitorių poveikį smegenims, Albert Sattin ir Theodor Rall 1970 metais padarė išvadą: adenozinui yra specifiniai receptoriai, kurie susiję su cAMP sinteze, o metilksantinai veikia kaip antagonistai. Atlikus farmakologinę analizę nustatyti du adenozino receptorių tipai: A1R ir A2R. Ilgą laiką manyta, kad A2R yra vienas receptorius. Atlikus išsamesnes studijas nustatyti du A2R receptoriai, kurie susieti su G<sub>s</sub> baltymu: A2AR ir A2BR. Paskutinis receptorius atrastas AR grupėje buvo A3R, tačiau neabejojama jo svarba įvairiuose fiziologiniuose procesuose. Klonavus visus receptorius pastebėta, kad jie priklauso vienai didelei 7-transmembraninių receptorių šeimai, kur 7 hidrofobiniai fragmentai pereina membraną.

### 3.2.1. A1 receptorius

A1R charakterizuojamas kaip glikoproteinas, kurio molekulinė masė, esant monomerinei formai 35-36 kD. Receptorius yra susijęs su keletu G-baltymų, kurių pagrindiniai yra G<sub>i</sub> (pertusi toksinui jautrūs) baltymai, sąlygojantys pagrindinį signalo perdavimą, per antrinę signalo perdavimo molekulę cAMP. Veikiant G<sub>i</sub> baltymą slopinama AC, sumažėja cAMP kiekis. Signalo perdavime taip pat dalyvauja fosfolipazė C, K<sup>+</sup> kanalai, Ca<sup>2+</sup> kanalai. Aktyvavus fosfolipazę C, padidėja inositoltrifosfato kiekis ir diacilglicerolio kiekis, kurie toliau veikia į kitas baltymų signalų perdavimo sistemas[19].

Neseniai pastebėta, kad baltymas egzistuoja ne tik monomerinėje formoje. Atrasti homodimerai ir heterodimerai su dopamino ir kitais purinerginiais (A2AR, P2Y1, P2Y2) receptoriais [20-22]. A1R aptinkamas daugelyje organų. Didelė raiška smegenyse (žievėje ir smegenėlėse), hipokampe, nugaros smegenyse, akyse, antinksčio liaukose, prieširdyje [23]. Vidutinė raiška kitose smegenų dalyse, skersaruožiuose raumenyse, kepenyse, inkstuose, riebaliniame audinyje, seilių liaukose, stemplėje, storojoje žarnoje, sėklidėse. Maža raiška plaučiuose, bronchuose, kasoje.

Receptorius pasižymi traukulius slopinančiu, raminančiu, neuroprotekciniu poveikiu. Apsauginis poveikis pasireiškia, esant išeminės reperfuzijos pažeidimo atvejais daugeliui organų: širdžiai, inkstams, plaučiams, kepenims [24-28].

A1AR veikimo mechanizmų nustatymui, išvestos šio geno nokauto pelės. A1R nokauto pelių fenotipas: normalus svoris, kraujo spaudimas, širdies susitraukimo dažnis, kūno temperatūra, bet padidėjusi baimė [29]. Epilepsijos tyrimuose, mechaniškai pažeidžiant smegenis, A1R nokauto pelėms buvo sukeliama epilepsija. Šiame tyrime A1R nokauto pelės pasižymėjo padidėjusiomis konvulsijomis ir užsitęsusiu *status epilepticus*, lyginant su kontroline grupe (turi A1R) [30]. Apsauginis poveikis pastebimas inkstų išemijos atveju. A1AR geno panaikinimas padidina išeminių inkstų pažeidimą. Manoma, kad aktyvavus A1R galima pagerinti išeminių ligų eigą *in vivo* [27]. Adenozino deaminazės (ADA) nokauto pelės pasižymėjo didesne A1R genų raiška alveolių makrofaguose. Atlikus dvigubą - A1R ir ADA genų nokautą, atsiranda plaučių uždegiminiai procesai, plaučių gleivinės metaplazija ir alveolių destrukcija. Šie pokyčiai siejami su padidėjusiu, Th2 limfocitų išskiriamų, citokinų: IL-4, IL-13, chemokinų ir matricos metaloproteazių kiekiu [31].

### 3.2.2. A2A receptorius

A2AR yra 45 kDa masės baltymas. Žmogaus ir pelės receptorius koduojanti seka sutampa 82,9%, o žiurkės ir pelės 94,6%. Genas randamas žmogaus 22-oje chromosomoje. Yra žinoma, kad A2AR kaip ir A1R gali suformuoti homodimerus bei heterodimerus su dopamino ir kanabinoidiniais receptoriais (D2, CB1, CB1-D2, D3) [32-35]. Priešingai nei A1 ir A3 receptoriai, A2AR yra susijungęs su G<sub>s</sub> baltymais. Signalo perdavimas vyksta aktyvuojant AC, padidėja cAMP kiekis, kuris dalyvauja tolimesniame signalų perdavime. Taip pat manoma, kad aktyvavus A2AR, aktyvuojamas mitogenų aktyvuotų baltymų kinazių (MAPK) signalo perdavimo kelias.

Receptorius aptinkamas daugelyje organizmo ląstelių. Didelė jo raiška blužnyje, užkrūčio liaukoje, leukocituose (limfocituose ir granulocituose), trombocituose, gama amino sviesto rūgšties moduliujamuose neuronuose, uoslės svogūnėliuose [36]. Vidutinė raiška širdyje, plaučiuose, kraujagyslėse, periferiniuose nervuose [37]. Maža raiška – smegenyse. A2AR vaidina svarbų vaidmenį moduliuojant vazodilataciją ir uždegimą. Vazodilatacinės savybės pritaikomos praktikoje. Uždegimo slopinimas - vienas iš pagrindinių efektų, kuriuos galima pasiekti, aktyvavus A2AR limfocituose ir granulocituose [38]. Aktyvavus A2AR slopinama smegenų veikla, moduliuojant gama amino sviesto rūgšties (GASR) apykaitą bei neigiamai reguliuojant dopaminerginę sistemą, sukeliamas antipsichotinis poveikis [39].

Pirmą kartą A2AR nokautas buvo atliktas naudojant CD1 rūšies peles [40]. A2AR geno neturinčiose pelėse, kofeinas, kuris stimuliuoja smegenų veiklą ir skatina tiriamąsias savybes,

pasižymėjo depresiniu poveikiu. A2AR nokauto pelės pasižymėjo didesniu bailumu, atliekant baimės testą, o patinai buvo agresyvesni įsibrovėliams [40]. Naudojant A2AR nokauto peles, įrodomas receptoriaus vaidmuo organizmo funkcijų reguliavime. Veikiant A2AR agonistais A2AR nokautų peles, nepastebima vazodilatacija. Inkstų išemijos atveju, veikiant agonistu ATL16e, nepastebimas apsauginis poveikis, A2AR chimerinėms pelėms, kurioms A2AR panaikintas kaulų čiulpu ląstelėse. Apsauginis poveikis aiškinamas padidėjusia prouždegiminių citokinių IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  gamyba [41]. A2AR panaikinimas pasižymi apsauginiu veikimu esant epilepsijai. A2A nokauto pelėse indukavus epilepsiją pentilentetrazoliu, buvo pastebėti sumažėję pažeidimai limbinėje sistemoje, lyginant su kontroline grupe [42]. Parkinsono ligos modelyje, kur neuronų pažeidimai susiję su  $\alpha$ -sinukleino mutacijomis, A2AR nokautai nepatyrė didesnių neuronų pažeidimų ir visiškai išsaugojo dopaminergines sinapses. Šis eksperimentas paaiškina kofeino (adenozino receptorių antagonistas) apsaugines savybes Parkinsono ligos atveju [43]. Neseniai atlikti tyrimai parodė, kad A2AR nokautams hipoksijos metu išsivysto PAH. Tačiau priežastys ir mechanizmas nėra visiškai aiškūs [7].

### 3.2.3. A2B receptorius

A2BR yra 36-37 kDa masės baltymas. Žmogaus receptoriaus aminorūgščių seka 86-87% atitinka žiurkės ir pelės aminorūgščių seką. Pelės ir žiurkės aminorūgščių seka atitinka 96%. Lyginant su kitais adenosino receptoriais A1R ir A2AR, A2BR atitinka tik 45 % aminorūgščių sekos [44]. Žmogaus A2BR randamas 17-oje chromosomoje. A2BR susijęs su G<sub>s</sub> baltymais, signalą perduoda aktyvuojant AC, kuri padidina cAMP kiekį. Taip pat A2BR yra susijęs su G<sub>q</sub> baltymais, kurie aktyvuoja fosfolipazę C ir padidina viduląstelinio kalcio kiekį. Tyrimai rodo, kad A2BR signalo perdavimas gali vykti aktyvuojant kinazes: ERK 1/2, JNK ir p38.

Receptoriaus raiška organuose skiriasi. Didelė raiška būdinga: aklojoje žarnoje, pūslėje, gaubtinėje žarnoje; vidutinė - plaučiuose, kraujagyslėse, akyje, mastocituose; maža raiška - riebaliniame audinyje, antinksčiuose, smegenyse, inkstuose, kepenyse, kiaušidėse, hipofizyje [45, 46]. A2BR vaidina svarbų vaidmenį uždegiminiuose procesuose [47, 48].

A2BR yra indukuojamas hipoksijos. Išaiškinta, kad padidėjusią A2BR genų raišką tiesiogiai lemia HIF-1  $\alpha$  transkripcijos faktorius, kuris jungiasi prie A2BR geno promotoriaus regiono [49]. Pagrindiniai A2BR efektai siejami su prouždegiminių citokinių IL-6, TNF- $\alpha$  gamybos slopinimu ir priešuždegiminių citokinių IL-10 gamybos padidėjimu. Šis poveikis pastebėtas plaučių pažeidimo sindromo, kolito ir Krono ligos eksperimentiniuose modeliuose [50, 51]. Bleomicino sukeltos PAH modelyje, naudojant A2BR nokautines peles ar veikiant A2BR antagonistu, pastebėti teigiami pokyčiai, įvertinus plaučių arterijos slėgį ir plaučių morfologiją [8]. Viena A2BR terapinio pritaikymo

galimybių yra blokuojant A2BR sumažinti uždegiminius procesus. Atliktų tyrimų duomenimis pastebėta, kad A2BR agonistai pasižymi apsauginiu poveikiu išeminės reperfuzijos atveju [52].

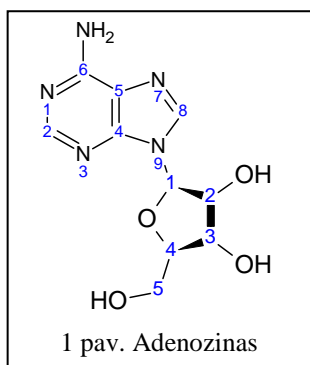
### 3.2.4. A3 receptorius

A3R yra 36 kDa masės baltymas. Tik 74% žiurkės A3R genų sekos atitinka žmogaus A3R genų seką. Žmogaus ir avies receptorių seka atitinka 85%. Receptoriaus skirtumai tarp rūšių apsunkina AR agonistų ir antagonistų kūrimą. A3R yra sudarytas iš 318 aminorūgščių [53]. A3R yra susijęs su  $G_i$  baltymais, kurie slopina adenilatciklazę ir mažina cAMP kiekį ląstelės viduje. Kitas signalo perdavimo būdas - fosfolipazės C aktyvavimas. Viduląstelinis C-galo receptoriaus regionas turi keletą serino ir treonino liekanų, kurios yra potencialios fosforilinimo vietos. Aktyvavus receptorių šios vietos fosforilinamos ir receptorius įtraukiamas į ląstelės vidų. Sumažėjus receptoriaus kiekiui viršuląstelinėje dalyje, sumažėja signalo perdavimas, tačiau veikiant agonistu ilgesnį laiką, viršuląstelinis receptoriaus kiekis atsistato.

Didelė receptoriaus raiška yra žiurkės kiaušidėse ir mastocituose [46, 54]. Vidutinė receptoriaus raiška: žmogaus smegenelėse, hipokampe, avies plaučiuose bei blužnyje. Maža raiška: skyd liaukėje, smegenyse, antinksčiuose, blužnyje, kepenyse, inkstuose, žmogaus kiaušidėse. Yra keletas nesutapimų atsižvelgiant į A3R raišką smegenyse. Naudojant *in situ* hibridizacijos modelį, nepavyko aptikti A3R, tačiau veikiant receptorių selektyviais agonistais bei taikant receptoriaus nokauto peles, įrodyta receptoriaus reikšmė smegenims [55]. Apsauginė funkcija, smegenų išemijos atveju, yra sudėtinga. Skirtingi agonistai, jų koncentracija, taip pat jų vartojimo laikas, tai faktoriai, kurie gali nulemti skirtingą efektą. Vartojant agonistus, prieš sukelti smegenų išemiją, pažeidimai yra didesni, tačiau aktyvuojant A3R po išemijos agonistai pasižymi apsauginiu veikimu [56]. Fokalinės smegenų išemijos atveju didesnė smegenų pažeidimai yra A3R nokautų pelėms [57]. A3R atlieka svarbų vaidmenį uždegiminiuose procesuose ir išemijos atvejais. Keletas tyrimų rodo A3R apsaugę funkciją, esant širdies išeminei reperfuzijai. A3R dalyvauja keičiant kraujagyslių pralaidumą, sumažina kardiomiocitų pažeidimus po miokardo infarkto [58-60]. Nepaisant mažos A3R genų raiškos širdyje, rezultatai pagrįsti A3R nokautų pelių modeliu [60].

A3 receptoriaus raiška limfocituose reguliuoja citokinų išskyrimą, tokiu būdu daro įtaką uždegiminiams procesams organizme. Nustatyta, kad A3R aktyvavimas pelių mastocituose, sukelia jų degranuliaciją, tačiau reikia atlikti daugiau tyrimų norint įrodyti receptoriaus reikšmę žmonėms. Pastebėta, kad dvigubo nokauto pelės - A3R ir ADA pasižymi daug mažesne eozinofilų infiltracija plaučiuose [61]. Tikslus mechanizmas sąlygojantis eozinofilų infiltraciją plaučiuose nėra žinomas. Taip pat pastebėta, kad A3R aktyvavimas mažina monocitų išskiriamą TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  išskyrimo

slopinimas yra perspektyvus būdas gydyti reumatoidinį artritą [62]. Inkstų išemijos atveju A3R nokautuotos pelės įgyja daugiau pažeidimų [63]. A3R yra dažnai išreikštas vėžinėse ląstelėse. Atlikta daug studijų, kai veikiant A3R, sustabdomas vėžinių ląstelių augimas arba padidinamas jautrumas chemoterapijai [64-66].



### 3.3. ADENOZINO RECEPTORIŲ AGONISTAI

#### 3.3.1. Adenozinas

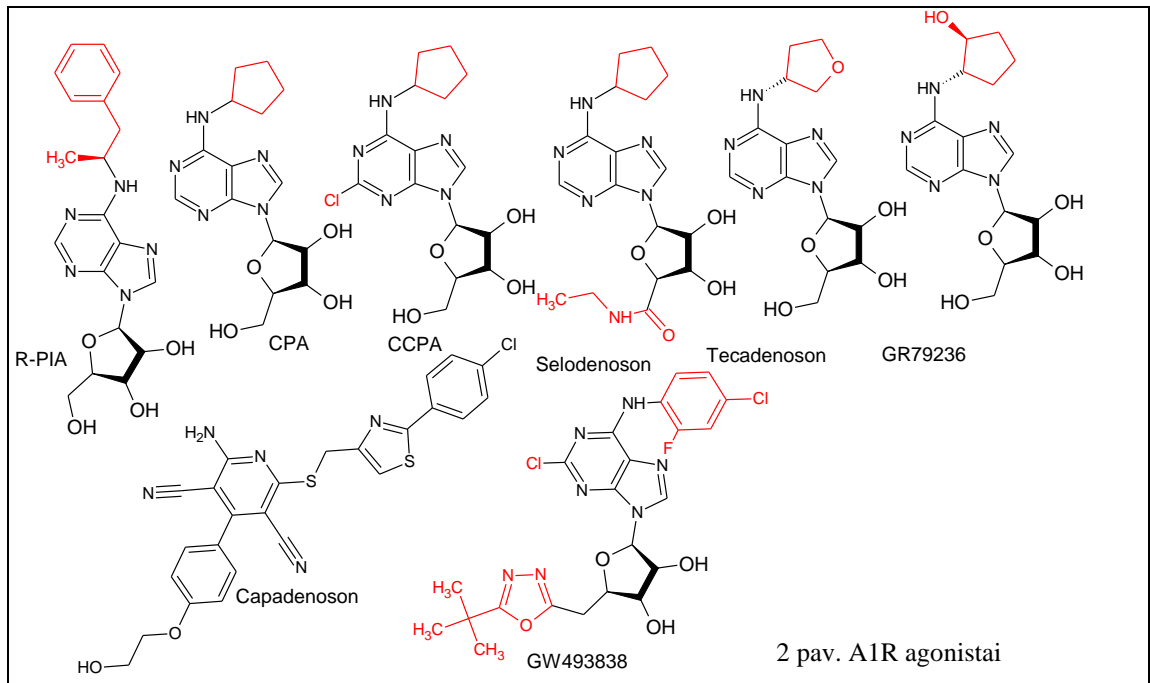
Adenozino terapiniam pritaikymui atliekami tyrimai daugelyje sričių: širdies išemijos, Parkinsono ligos, miego sutrikimų ir kt. Adenozinas ir dipiridamolis yra vieni iš pagrindinių širdies vainikinių kraujagyslių vazodilatatorių, kurie vartojami du dešimtmečius, po registracijos maisto ir vaistų agentūroje JAV 1990 metais. Adenozinas, firminiu pavadinimu „Adenocard“, vartojamas norint sustabdyti paroksizminę supraventrikulinę tachikardiją (PSVT). Kitas adenozino preparatas „Adenoscan“ yra farmakologinio streso agentas, kuris padidina vainikinių kraujagyslių pralaidumą, atliekant širdies scintiografiją su taliu-201 [67]. Daugelio kitų adenozino analogų klinikinių tyrimų rezultatai yra daug žadantys, tačiau užregistruota tik keletas naujų vaistų [68].

Adenozinas - tai natūraliai susidarantis AR agonistas, turintis trumpą gyvavimo pusperiodį 3–6 s. Jis pasižymi skirtingu giminingumu adenozino receptoriams. Didžiausias giminingumas A1R (žmogaus) Ki: 100nM, tris kartus mažesnis A2AR (žmogaus) Ki:310nM, panašus A3R (žmogaus) Ki:290nM ir mažiausias giminingumas į A2BR (žmogaus) Ki:15000nM [69]. Metabolinis stabilumas riboja ilgesnį adenozino poveikį, tačiau greitas skilimas yra parankus gydant PSVT. Nepaisant greito metabolizmo, šalutinis poveikis neišvengiamas, nes adenozinas jungiasi neselektyviai prie keleto receptorių. Šalutinis poveikis pasireiškia dusuliu, galvos, krūtinės skausmu ir kt [70].

Uždegiminių citokinų ir kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus išsiskyrimas pacientams vartojantiems adenoziną, yra viena iš sričių, kurioje klinikinius tyrimus vykdo Vanderbilto universitetas [71]. Tyrimai laikinai sustabdyti. Kardioprotekcinis poveikis tiriamas Ottawos širdies institute. Nustatoma ar profilaktiškai vartojant adenoziną galima išvengti miokardo nekrozės, po kraujagyslių stenavimo. Neseniai tyrimas buvo sustabdytas [72]. Taip pat vykdomi klinikiniai tyrimai,

kuriuose adenzinas taikomas neuropatinio skausmo gydymui, jo veiksmingumas lyginamas su klonidinu [73].

### 3.3.2. A1 receptoriaus agonistai



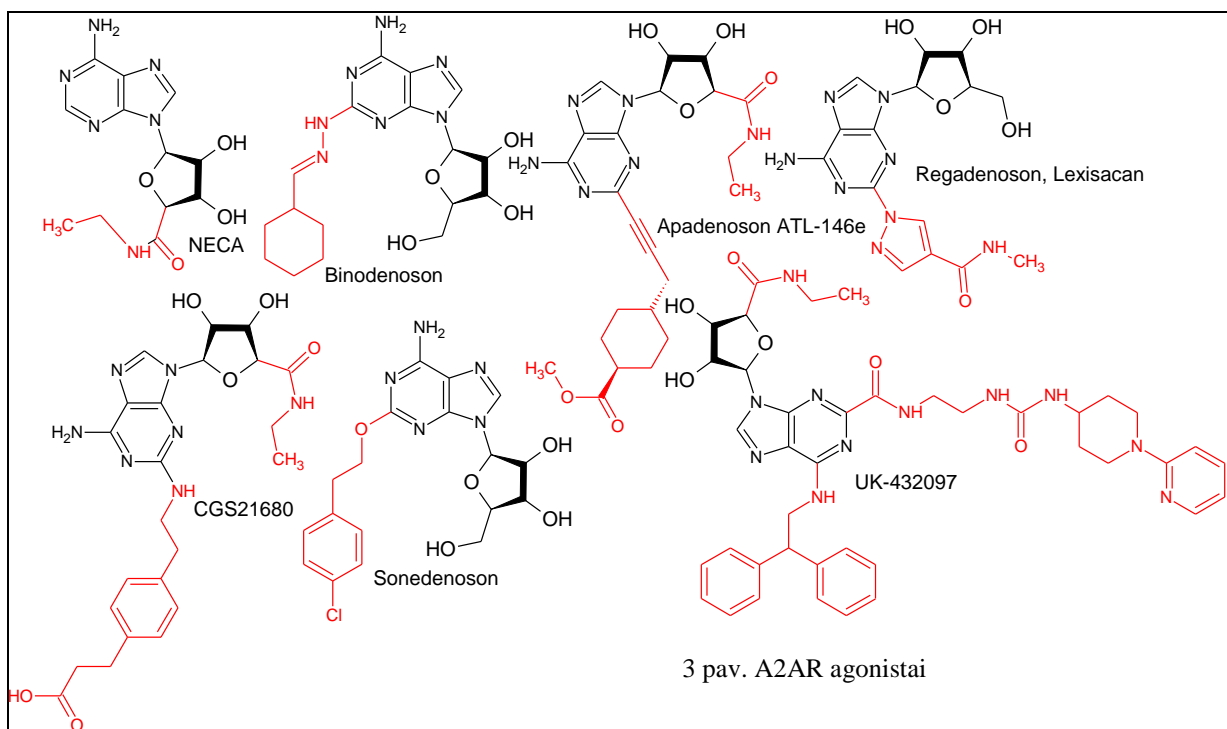
Norint padidinti selektyvumą A1R, pirmosios adenzino modifikacijos atliktos prie N6 amino grupės, įvedant cikloalkanus ar aromatinės fenilo liekanas. Šios modifikacijos suteikia junginiam atsparumą adenzino deaminazei (ADA) bei prailgina junginio gyvavimo pusperiodį [74]. Kuriant selektyvesnius ir veiksmingesnius agonistus, įvesti pakaitai 2-oje padėtyje ir atliktos modifikacijos ribozės liekanoje. Vienas iš pirmųjų selektyvių A1R agonistų R-PIA, kuris turi pakaitus N6-oje padėtyje įvestą izopropilfenil liekaną, plačiai naudotas *in vitro* ir *in vivo* eksperimentuose [75]. Ciklopentilo įtraukimas N6-oje padėtyje suteikė selektyvumo A1R, o preparatas pavadintas CPA. Tolimesni pakeitimai vyko pakeičiant vandenilį chloru 2-oje padėtyje, sudarytas junginys CCPA, kuris pasižymėjo 4 kartus padidėjusiu selektyvumu A1R ir 2 kartus geresniu giminingumu lyginant su CPA ir R-PIA [76]. Pastebėta, kad pasiekus 35μM koncentraciją CPA veikia kaip antagonistas žmogaus A3AR [77]. Pirmasis A1R agonistas ne adenzino pagrindu buvo sukurtas Bayer kompanijos, tai 2-amino-3,5-dicianopiridino darinys Capadenoson.

Neseniai baigti klinikiniai tyrimai su Capadenoson, skirti stabilios krūtinės anginos gydymui. Atlikus fizinio krūvio testą, pastebėti teigiami pokyčiai, gydant su Capadenoson [78]. Kiti agonistai Seladenoson, Tecadenoson dalyvauja prieširdžių virpėjimo ir PSVT klinikinių tyrimų pirmoje ir antroje stadijose. Rezultatai rodo, kad jų efektyvumas prilygsta adenzinui. Taip pat jie pasižymi



mažesniu šalutiniu poveikiu [79, 80]. Kiti klinikiniai tyrimai, skirti neuropatinio skausmo ir hiperlipidemijos gydymui, vartojant A1R agonistus GW493838 ir GR79239, nutraukti.

### 3.3.3. A2A receptoriaus agonistai

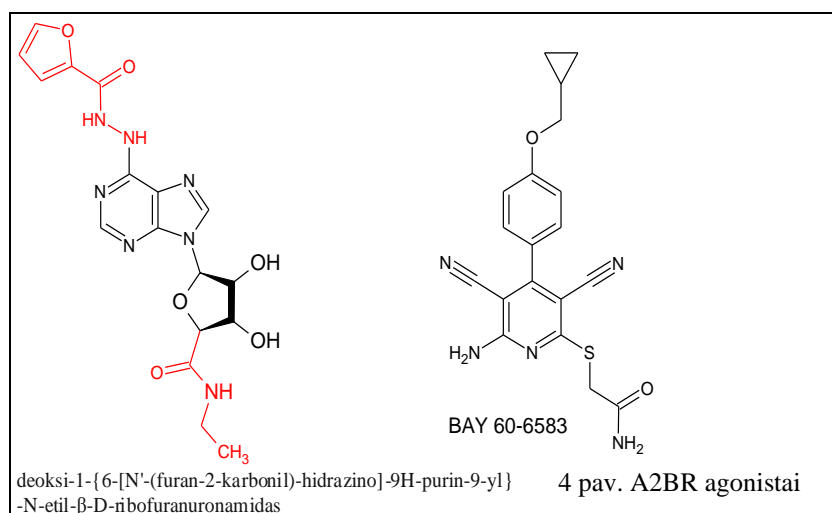


Po ilgų struktūros aktyvumo ryšio studijų buvo sukurti A2AR agonistai. Prieš surandant naujus ligandus, NECA buvo selektyviausias A2AR agonistas. Susintetinti adenzino analogai su antrinių aminų, tioeterių pakaitais 2-oje padėtyje, parodė padidėjusį selektyvumą A2AR. CGS21680 vienas iš plačiai naudojamų junginių, su 2-oje padėtyje esančiu paraetilkarboksifeniletilamino pakaitu ir alkiluronamido modifikacija esančia ribozės 5-oje padėtyje. Deja, CGS21680 stipriau veikia žiurkės A2AR nei žmogaus receptorių. Kuriant selektyvius ligandus adenzino receptoriams, verta atsižvelgti į receptorių skirtumus tarp rūšių [81]. Toliau tobulinant agonistus sukurtas Apadenoson (ATL-146e), kuris penkis kartus efektyvesnis negu CGS21680. Pagrindiniai pakeitimai įvykdyti 2-oje padėtyje, įtraukiant 2-propin-1-il-cikloheksiankarboksilinės rūgšties metilo esterį, o modifikacijos ribozės liekanoje paliktos [82].

Apadenoson pasiekė klinikinių tyrimų trečią stadiją, tiriant miokardo diagnostikos preparatus. Prieš vykdant tyrimus buvo tikimasi, kad vaistas bus gerai toleruojamas, saugus, neblokuos atrioventikulinio mazgo bei nesukels bronchų spazmo [83]. Apadenoson pateisino tyrėjų viltis. Tačiau kol preparatas yra klinikinių tyrimų trečioje stadijoje, pirmasis selektyvus A2AR agonistas jau užregistruotas maisto ir vaistų agentūroje JAV (angl. FDA). 2008 metais užregistruotas pirmasis

adenozino analogas Regadenoson (Lexiscan) skirtas vartoti kaip pagalbinis vazodilacinis agentas atliekant miokardo diagnostiką. Regadenoson 2-oje padėtyje turi 4-(metilamino)karbonil-1H-pirazol-1-il pakaitą, kuris padidina selektyvumą A2A receptoriui. Šis preparatas pasižymi 10 kartų mažesniu jungimusi su A1R, taip pat mažu jungimusi su A2BR ir A3R [84]. Regadenoson pasižymi šiais farmakokinetiniais parametrais: greita vaisto veikimo pradžia (pasiekama maksimali vaisto koncentracija po 1-4 minučių) ir trumpas vaisto poveikis. Šalutiniai poveikiai lyginant su adenzinu, pasireiškia rečiau, pacientams sergantiems kvėpavimo takų ligomis. Šalutiniai poveikiai panaikinami, vartojant AR antagonistą aminofiliną [84-86]. Kiti klinikiniai tyrimai atliekami su UK-432097, sonedenoson, binodenson, tiraimos jų priešūždegiminės savybės. Pastebėta, kad preparatai sukelia šalutinius poveikius: vazodilataciją, hipotenziją. Ateityje sukurtos selektyvios vaistų nunešimo technologijos galėtų išspręsti šią problemą [87].

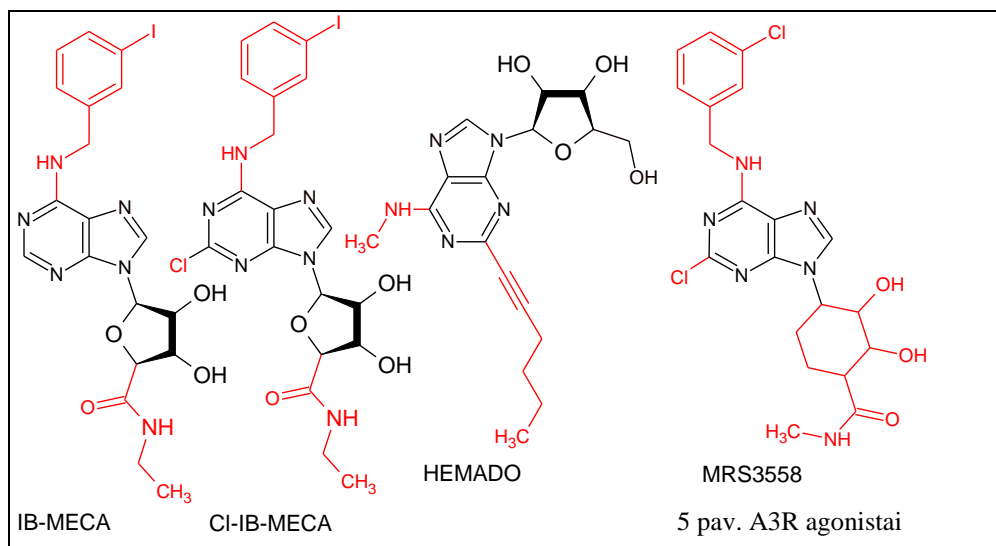
### 3.3.4. A2B receptoriaus agonistai



A2BR yra receptorių, kuris turi mažą giminingumą adenzinui. Ilgą laiką buvo sunku sukurti selektyvų A2BR agonistą. NECA buvo pats efektyviausias A2BR agonistas,  $EC_{50}$  siekė 140 nM. Neseniai susintetinti du nauji A2BR agonistai, kurie pasižymi dideliu giminingumu receptoriui. Vienas iš jų yra adenzino struktūrą turintis deoksi-1-[6-[N'-(furan-2-karbonil)-hidrazino]-9H-purin-9-il]-N-etil-β-D-ribofuranuronamidas, kuris priklauso 6-(heteroaril-karbonil)-hidrazino-NECA grupei, turinčiai 2-furil pakaitus [88]. Taip pat ne adenzino analogas BAY 60-6583 2-[6-amino-3,5-diciano-4-[4-(ciklopropilmetoksi)fenol]piridin-2-ilsulfanil] yra vienas iš 2-aminopuridin-3,5-dikarbonitril junginių grupės, kuris tiriant su rekombinantiniais žmogaus AR išreikštais kinų žiurkėno kiaušidžių ląstelėse (CHO) pasižymėjo selektyvumu A2BR. ( $EC_{50} > 10000$ nM A1R, A2AR, A3R, išskyrus  $EC_{50} = 3$ nM) [89]. Atliekant iki klinikinius tyrimus aterosklerozei gydyti, BAY 60-6583 pasižymėjo kepenų

transkripcijos faktoriaus SREBP-1 pokyčiais, kurie siejami su sumažėjusiu bendru lipidų kiekiu kraujyje [90]. Rezultatai daug žadantys, todėl ateityje bus pradėti klinikiniai tyrimai.

### 3.3.4. A3 receptoriaus agonistai

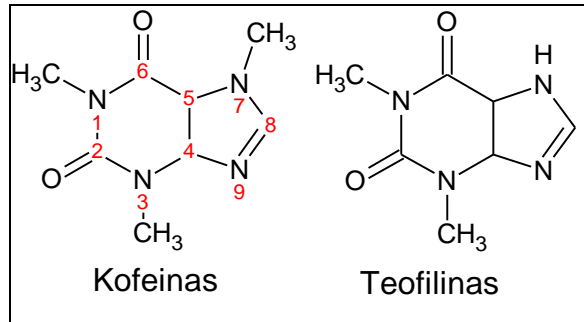


A3R yra mažo giminingumo receptoriūs. Selektivių ligandų dizainas šiam receptoriui pagrįstas hidrofobinių pakaitų įvedimu N6-oje ir 2-oje adenozino padėtyse. Taip pat atliekamos ir ribozės liekanos modifikacijos. Sudarius amidus, eterius 5-oje ribozės padėtyje, padidėja selektyvumas. Ilginant alkilo grandinę N6 padėtyje selektyvumas sumažėja, o įvedant ciklopentil, ciklobutil liekanas padidėja selektyvumas į A1R [91]. Įterpus mažas metil, oksimetil grupes N6 padėtyje, selektyvumas padidėjo 10 kartų į žmogaus A3R [92]. Įterpus 2-oje padėtyje ciano grupę giminingumas ir efektyvumas sumažėjo, kai N6-oje padėtyje buvo įvesti 3-iodobenzil ir trans-2-fenilciklopropil pakaitai. Tačiau 2-padėtyje įvedus ciano ir N6-oje padėtyje metilo grupes junginys veikia kaip A3R agonistas [93]. Modifikavus adenoziną įterpiant 3-iodobenzoil pakaitą N6-oje padėtyje, Cl 2-oje padėtyje ir 5' metilkarboksiamido grupe ribozės liekanoje gautas - Cl-IB-MECA. Cl-IB-MECA-A3R agonistas, kuris yra selektyvesnis žiurkės, o ne žmogaus A3R [94]. Cl-IB-MECA yra vienas iš pirmųjų selektivių A3R agonistų, jis naudojamas daugelyje *in vitro* ir *in vivo* studijų. Sukurta ir naujesnių agonistų pvz.: HEMADO, CF502 jie taip pat naudojami tyrimuose [95, 96].

Keletas agonistų IB-MECA (CF101), Cl-IB-MECA (CF102) dalyvauja klinikiuose tyrimuose kepenų vėžio, reumatoidinio artrito, psoriazių, sausų akių sindromo, giukomos gydyme [97, 98, 99, 100]. Naujas junginys MRS3558 (CF502) yra vienas iš efektyviausių A3R agonistų,

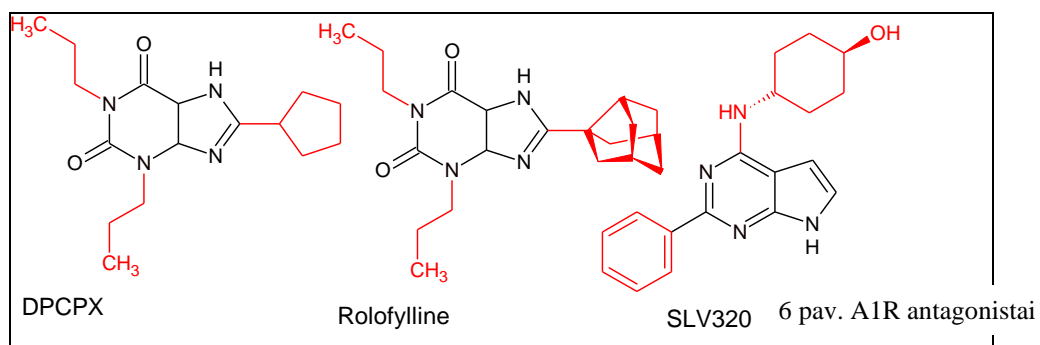
efektyvesnis už IB- MECA. MRS3558 preparato efektyvumas reumatoidinio artrito iki klinikiniuose tyrimuose vertinamas teigiamai [62].

### 3.4. Adenozino receptorių antagonistai



Geriausiai žinomi ne selektyvūs AR antagonistai yra kofeinas ir teofilinas. Kofeinas vartojamas jau keletą tūkstančių metų. Daugelis šiandien vartojamų gėrimų turi kofeino. Teofilinas yra kofeino metabolitas. Jis pradėtas vartoti kaip diuretikas nuo 1902 metų. Po 20 metų teofilinas pradėtas vartoti astmos gydyme. Nors kofeinas ir teofilinas yra AR antagonistai, tačiau jų giminingumas receptoriams yra mažas [101]. Sukurti antagonistai pasižymintys didesniu giminingumu. Dažniausiai atliekamos modifikacijos 1-3-7 padėtyse. Taip pat surasti ne purino pagrindą turintys AR antagonistai.

#### 3.4.1. A1 receptoriaus antagonistai

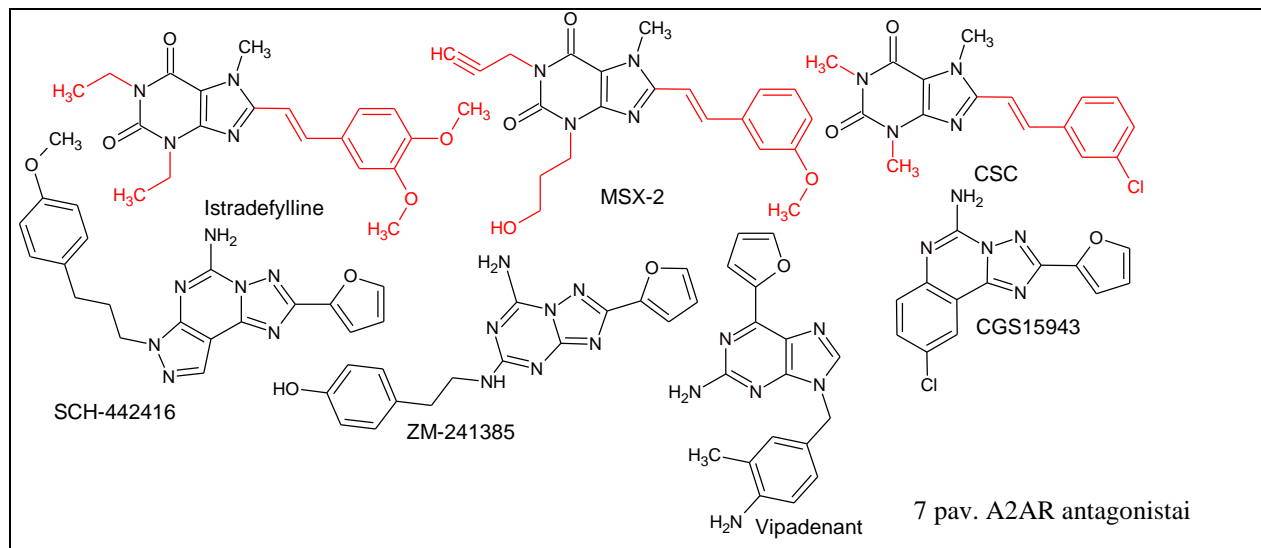


Vienas pirmųjų A1R antagonistų – DPCPX, turi propilo pakaitus ksantino 1,3-oje padėtyse ir ciklofenilo 8-oje padėtyje [102]. DPCPX pasižymi dideliu selektyvumu A1R, bet nedideliu antagonistiniu aktyvumu žmogaus A1R. Atlikus nedidelius pokyčius DPCPX, 8-oje padėtyje įvedant noradamanilo liekaną vietoj ciklopentilo, gautas Rolofylline (KW-3902). Šis antagonistas klinikiniuose tyrimuose skirtas pacientams, sergantiems širdies nepakankamumu. Pirmi rezultatai buvo daug žadantys. Rolofylline (1,3-dipropil-8-(3-noradamantil)ksantinas) vartojamas intraveniniu būdu, pagerino ligos eigą. Taip pat pasižymėjo apsauginiu poveikiu inkstams. Apsauginis mechanizmas

paiškinamas preparato vazodilacinėmis savybėmis bei padidinta glomerulų filtracija [103, 104]. Tačiau atlikus „PROTECT-2“ klinikinius tyrimus, su didesne tiriamųjų grupe, pirminiai duomenys nepatvirtinti.

SLV320 yra selektyvus A1R antagonistas, kurio pagrindas yra 7-deazapurinas su N6-oje padėtyje esančiu pakaitu. Šis preparatas klinikiniuose tyrimuose skirtas pacientams, sergantiems širdies nepakankamumu. Antagonistas buvo vartojamas kaip papildoma priemonė skatinti natriurezę ir diurezę. Pradiniai duomenys yra teigiami. Tačiau norint įvertinti preparato efektyvumą reikėtų atlikti tyrimus su didesnėmis tiriamųjų grupėmis [105]. AR mechanizmų nustatymui taikoma pozitronų emisijos tomografija, kur vartojamas A1R antagonistas 8-ciklopentil-1propil-3-(3-[18F]fluoropropil)ksantinas [106].

### 3.4.2. A2A receptorių antagonistai



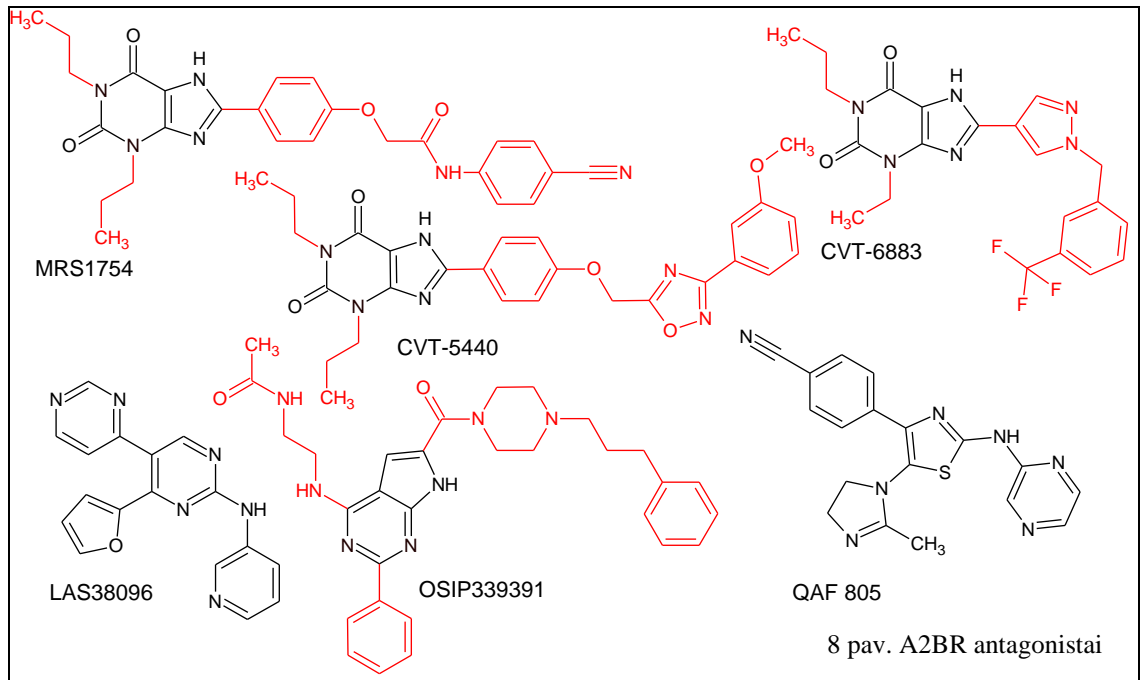
7 pav. A2AR antagonistai

Pirmieji A2AR antagonistai buvo kuriami keičiant ksantino pagrindą. Prijungti stirilo pakaitai 8-oje padėtyje į ksantino pagrindą, pasižymėjo A2AR antagonistinėmis savybėmis. Sukurta visa grupė junginių, iš kurių geriausi: Istradefylline (KW-6002), CSC, MSX-2, buvo vartojami daugelyje *in vivo* eksperimentų. Istradefylline pirmasis, kuris buvo išbandytas klinikiniuose tyrimuose Parkinsono ligai gydyti, tačiau jis neparodė didelio aktyvumo lyginant su klinikinėje praktikoje vartojamais dopaminerginiais vaistais [107, 108].

Tolesnės modifikacijos, kuriant A2AR antagonistus, atliktos prie ksantino pagrindo pridendant trečią ciklą ar įterpiant heterociklą. Sudaromos tokios junginių grupės: tiazolchinazolainai, triazoltriazinai, triazolpirimidinai, pirazolotriazolopirimidinai. Aktyviausi junginiai: CG15943, ZM241385, Vipadenant, SCH442416. Šių junginių efektyvumas Parkinsono ligos gydymui stebimas

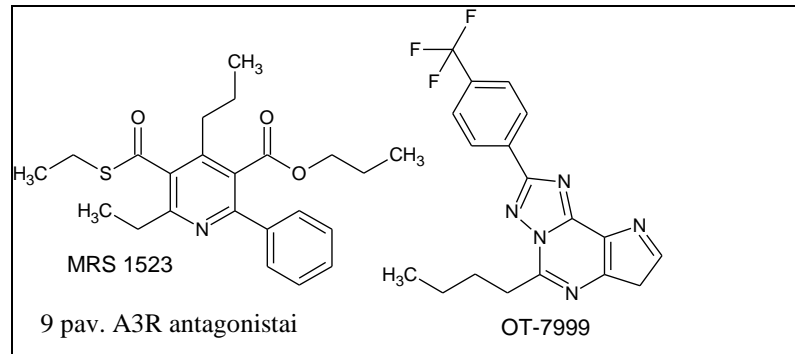
klinikiniuose tyrimuose. Modifikuojant dopaminerginio signalo perdavimo kelius vaistais, netiesiogiai veikiančiais į dopamino receptorių, atveriami nauji keliai neurodegeneracinių ligų gydymui, kurių patogenezė susijusi su sutrikusia dopamino apykaita (Alzheimerio, depresijos ir priklausomybių).

### 3.4.3. A2B receptorių antagonistai



Pastebėta, kad 8-fenilksantino dariniai turi A2BR antagonistinių savybių. Vienas iš pirmųjų A2BR antagonistų 8-fenilksantino junginys MRS-1754, su p-cianoanilido pakaitu 8-oje ksantino padėtyje [109]. Tolimesni patobulinimai, p-cianoanilidą pakeitus į 5-fenil-1,2,4-oksadiazolą, sukurtas analogas CVT-5440. Tačiau šie pakeitimai sumažina junginio tirpumą [110]. Kiti ksantino serijos pakaitai CVT-6883 (GS-6021) su 8-oje padėtyje esančiu pakaitu 3-(trifluorometil)benzil)-1H-pirazol-4-il pasižymėjo geru giminingumu ir selektyvumu A2BR. Įvertinti CVT-6883 tinkamumą astmai gydyti, atliekami klinikiniai tyrimai. Pirmoje klinikinių tyrimų stadijoje preparatas yra gerai toleruojamas. Taip pat atliekami ir kitų A2BR antagonistų (ATL-844, LAS38096, OSIP339391, QAF805) klinikiniai tyrimai astmai ir kitoms su uždegimu susijusioms ligoms gydyti [111].

### 3.4.4. A3 receptoriaus antagonistai



Modifikuojant ksantinų farmakoforą kol kas nepavyko rasti selektyvių A3R antagonistų. Tačiau modifikuojant 1,4-dihidropiridino, piridino, flavonų, chinazolino molekulių pagrindus pastebėta, kad junginiai pasižymi antagonistinėmis savybėmis. Vienas iš pirmųjų A3R antagonistų MRS1523 [112]. Daugelis kitų junginių grupių taip pat pasižymi selektyviu poveikiu A3R, tačiau ne daug junginių dalyvauja klinikiniuose tyrimuose. Tikimasi, kad OT-7999 pasieks glaukomos klinikinius tyrimus. Taip pat daug tikimasi iš tiazolo junginių, kurie pasižymi antialerginėmis savybėmis [113].

### 3.5. Plaučių arterijos ir plaučių smulkių kraujagyslių endotelio ląstelės

Kraujagyslių endotelio ląstelės dengia visus kraujo indus, taip tiesiogiai kontaktuodamos su krauju. Net mažiausi kapiliarai yra padengti endotelio ląstelėmis. Endotelis taip pat dengia ir limfagysles. Suaugusio žmogaus kraujagyslių endotelis sudarytas maždaug iš  $6 \times 10^{13}$  ląstelių, sveria apie 1 kg, ir dengia apytikriai  $700 \text{ m}^2$  [114]. Plaučių endotelio ląstelės atlieka keletą funkcijų: barjero, signalų perdavimo, pralaidumo, uždegiminę, kraujo koaguliacijos, taip pat dalyvauja riebalų metabolizme. Šias funkcijas endotelis reguliuoja per ląstelės membranoje esančius receptorių, baltymų (pvz.: augimo faktorius, koaguliacinius ir nekoaguliacinius baltymus), metabolitus (pvz.: azoto oksidas ir serotoninas), hormonus (pvz. endotelinas-1). Taip pat svarbios specifinės ląstelių jungtys, kurios nulemia ląstelė – ląstelė ir ląstelė – matrica sąveikas.

Plaučių endotelis yra didžiausias žmogaus kūne. Taip pat pasižymi savo išskirtinumu lyginant su kitų kraujagyslių endotelium. Plaučių arterijos ir plaučių smulkių kraujagyslių endotelis skiriasi, todėl būtina atsižvelgti į šį faktą studijuojant su plaučių endotelium susijusias ligas. Yra keletas faktorių, kurie skiria plaučių endotelio ląsteles, tai be abejonės keičia jo funkcijas, fiziologinį atsaką. Glikokaliksas yra svarbus plaučių endotelio ląstelių pralaidumui ir imuninės sistemos atsako reguliavimui [115]. Įrodyta, kad jis skiriasi tarp PAE ir PSKE ląstelių. Lektinų jungimosi eksperimente

išaiškinta, kad *Griffonia simplicifolia* lektinai jungiasi tik prie PSKE ląstelių, o lektinai iš *Helix pomatia* jungiasi tik prie PAE ląstelių [116, 117]. Weibel-Palade kūnų, kurie kaupia Von Willebrando faktorių (susijęs su trombo formavimu) ir P-selektiną (susijęs su neutrofilų adhezija), nėra PSKE ląstelėse. Tačiau šiuos faktorius PSKE ląstelės sintetina ir išskiria, todėl manoma, kad jų reguliacija vyksta, pasitelkiant kitą mechanizmą [118]. Kraujagyslių pralaidumas yra skirtingas plaučių arterijoje ir smulkiosiose kraujagyslėse, todėl manoma, kad tai priklauso nuo skirtingų endotelio ląstelių. Stipresnis ląstelių jungčių sudarymas yra vienas iš faktorių, sąlygojančių kraujagyslių pralaidumą. PSKE ląstelės suformuoja stipresnes jungtis, lyginant su PAE ląstelėmis, tačiau tikslus jungčių formavimo mechanizmas nėra žinomas [119].  $Ca^{2+}$  signalų perdavimas yra svarbus faktorius, reguliuojant kraujo indų pralaidumą. Tapsigarginas yra seskviterpeninis laktonas, kuris veikia slopindamas sarkoplazminio retikulo  $Ca^{2+}$  ATFazes ir padidina citozolinį kalcio kiekį. Po tapsigargino stimuliacijos, pastebėti  $Ca^{2+}$  pokyčiai PAE ląstelėse, o ne PSKE [119, 120]. Atlikus plaučių perfuziją *in situ* pastebėti skirtingi efektai, veikiant tapsigarginu ir 4 $\alpha$ phorbol-12,13 didekanoatu (4 $\alpha$ PDD). Paveikus tapsigarginu pastebėtas perivaskulinis skysčių kaupimasis prie didelių kraujo indų, tuo tarpu veikiant 4 $\alpha$ PDD, sukeltas skysčių kaupimasis alveolėse. 4 $\alpha$ PDD aktyvuoja baltymą, pereinamojo receptorių potencialo katijonų šeimo V narį 4 (TRPV4), kuris sukelia PSKE ląstelėse pokyčius, sąlygojačius alveolių prisipildymą skysčiu [121, 122]. Kitas svarbus faktorius, kuris diferencijuoja plaučių endotelio ląstelių tipus, yra N-katherino ir aktyvuotos leukocitų adhezijos molekulės (ALCAM) raiška. PSKE ląstelėse šių molekulių raiška *in vitro* yra daug didesnė, lyginant su PAE ląstelių, tokie patys rezultatai pastebėti *in situ*. Šie baltymai siejami su stipresnių tarpląstelinėmis ryšiu skirtumais tarp endotelio ląstelių [123]. Endotelio ląstelių proliferacija dar vienas svarbus faktorius palaikant barjerą. PSKE pasižymi greitesne proliferacija lyginant su PAE ląstelėmis. PAE ląstelės sustoja daugintis panaikinus serumą iš augimo terpės, o PSKE ląstelės kurį laiką vis dar dauginasi. Padidėjęs proliferacijos potencialas paaiškinamas hiperfosforilintu (neaktyviu) retinobalstomos baltymu (Rb) PSKE ląstelėse. Rb yra vienas iš auglio supresorių, tuo tarpu PAE ląstelėse šis baltymas yra hipofosforilintas. Taip pat Ciklino D1 raiška didesnė PSKE ląstelėse. Ciklino D1 padidėjusi raiška yra dažnas reiškinys vėžinėse ląstelėse [124].

### 3.5.1. Hipoksijos poveikis plaučių endotelio ląstelėms

Hipoksija – būseną, kai organizmas negauna reikiamo deguonies kiekio. Hipoksijos pavyzdys yra aukštumų efektas žmogui, kuris sukelia aukštumų ligą - plaučių edemą, smegenų edemą, PAH. Žmonės, kurie turi sutrikimų kardiopulmonarinėje sistemoje, turi padidėjusį polinkį susirgti pirmine plaučių arterijos hipertenzija. Hipoksija taip pat yra vienas iš faktorių, sukeliančių ūmų kvėpavimo



nepakankamumo sindromą ir išeminius pažeidimus [125]. Terapiniu požiūriu yra sunku nuspręsti, kuriuos signalo perdavimo kelius reikėtų modifikuoti, norint atstatyti fiziologinius pakitimus ar juos slopinti.

Plaučių endotelio ląstelių atsakas į hipoksiją yra neabejotinas. Hipoksija sąlygoja padidėjusį kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus (VEGF) kiekį, kuris vaidina svarbų vaidmenį ląstelių diferenciacijoje ir proliferacijoje [126]. Manoma, kad tai yra vienas iš faktorių, kuris galimai sąlygoja PAH [127]. Hipoksija skatina uždegiminių citokinų išsiskyrimą: TNF- $\alpha$  ir IL-1 $\beta$ , kurie išskiriami iš plaučių arterijos audinio, tačiau jų išskyrimas gali būti užslopintas užblokavus baltymų kinazę C [128]. Eritropoetinas glikobaltymas – hormonas, kuris reguliuoja eritrocitų gamybą ir adaptaciją prie hipoksinių sąlygų. Eritropoetino receptoriai, kuriuos veikia eritropoetinas, yra ne tik eritrocituose, bet ir plaučių endotelio ląstelėse. Žmogaus plaučių endotelio ląstelės, esant hipoksijai, padidina eritropoetino receptoriau raišką. Jungiantis eritropoetinui stimuliuojama azoto oksido (NO) gamyba. Hipoksija sumažina endotelio NO sintazę (eNOS) [129]. Taip pat padidėjęs su natriu susieto neutralių amino rūgščių nešiklio (SNAT1) kiekis plaučių endotelio ląstelėse, esant hipoksijos sąlygoms, padidina L-citrulino (NO sintezės produktas) pernešimą į plaučių endotelį, kas gali įtakoti NO sintezę [130]. Taip pat pastebėta, kad hipoksija sumažina angiotenziną konvertuojančio fermento (AKF) kiekį. PSKE ląstelėse hipoksija daugiau sumažina AKF, nes jo yra daugiau normaliose sąlygose lyginant su PAE ląstelėmis. Tačiau angiotenzino konvertuojančio fermento kiekis ir aktyvumas esant hipoksijai skiriasi tarp rūšių [131]. Pastebėta, kad PSKE ląstelės suformuoja stipresnį sluoksnį hipoksijos metu, dėl ras homologo geno šeimos kinazės A (RhoA) sumažėjimo *in vitro* [132]. *In vivo* padidėjęs pralaidumas esant hipoksijai buvo sumažintas, padidinus adenosino koncentraciją slopinant ADA (kuri yra indukuojama hipoksijos metu) [133]. Tai parodo, koks yra svarbus adenosino vaidmuo, esant hipoksijai.

## 4. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

### 4.1. RNR išskyrimas

RNR išskyrimui naudotas RNR gryninimo rinkinys - E.Z.N.A.® (Total RNA Kit I, Omega). RNR iš užšaldytų audinių ar iš ląstelių lizatų išskirta naudojant kolonėlinį išskyrimo metodą (Omega) paveikiant DNaze-1(Sigma Aldrich). Prieš atliekant išskyrimą pipetės ir darbo aplinka buvo paruošta, nuvalant RNaseZAP (Ambion) pašalinti RNazes ir DNazes dėl galimo mėginių užteršimo. Naudojami pipečių antgaliai tik su filtrais skirti RNR ir DNR darbui.

Ekstrakcijos procedūra vykdyta, kaip nurodyta protokole.

1. Ląstelės ar užšaldytas audinys (plaučiai) paveikiami lizavimo buferiu.
2. Mėginys homogenizuojamas išmaišant pipete (ląsteles) ar homogenizatorium (audinį).
3. Pridedama vienodas kiekis etanolio (96-100%) ir mėginys sumaišomi vartant.
4. Mėginys užnešamas ant kolonėlės (HiBind® RNA), kuri įdedama į centrifugavimo mėgintuvėlį. Centrifuguojama 10,000 x g, 60 sekundžių, kambario temperatūroje. Nucentrifuguotas lizatas išpilamas.
5. Mėginys plaunamas su plovimo buferiu I vieną kartą. Centrifuguojama 10,000 x g 60 s.
6. Užnešama DNazė-I tiesiai ant kolonėlės ir inkubuojama kambario temperatūroje 15 min.
7. Plaunama kartą su plovimo buferiu I, kuris praskiestas su etanoliu. Centrifuguojama 10,000 x g 60 s.
8. Plaunama du kartus su plovimo buferiu II, kuris paruoštas praskiedžiant etanoliu. Centrifuguojama 10,000 x g 60 s.
9. Išsausinama kolonėlė centrifuguojant 16,000 x g 120 s.
10. Išskiriant RNA kolonėlė plaunama DEPC paveiktu vandeniu į švarų mėgintuvėlį

## 4.2. RNR kokybės kontrolė

RNR kokybė ir kiekybė nustatyta spektrofotometru Nano drop. 260/280 nm absorbcijos pikų santykis buvo nuo 1.8 iki 2, kas nurodo pirminių priemaišų nebuvimą bei įvertina gautos RNR kiekį. Tolimesnė RNR analizė atlikta naudojant Agilent bioanalizer 2100 – mikroskysčių technologijos pagrindu veikiančią kapiliarinę elektroforezę, kurios metu nustatoma RNR kokybė ir kiekybė. Atvirkštinei transkripcijai naudota RNR buvo ne žemesnės kaip 8-10 RIN (RNR integralumo skaičius) reikšmės, tai nurodo gerą RNR kokybę.

## 4.3. *In vitro* DNR sintezė panaudojant RNR matricą

kDNR (komplementari DNR) pagaminta atlikus atvirkštinę transkripciją iš išskirtos RNR. Šiam metodui atlikti buvo naudojamas atvirkštinės transkripcijos rinkinys iš Applied Biosystems. 1μg RNR buvo paimta atlikti reakciją. Prieš atliekant procedūrą stalas ir pipetės buvo nuvalyti naudojant RNaseZap (Ambion). Skiedimai atlikti naudojant vandenį be nukleazių. Naudoti antgaliai ir mėgintuvėliai skirti darbui su DNR ir RNR. 10X reakcijos buferio, 25X (100mM) dNTP mišinys, 10X atsitiktiniai pradmenys, MultiScribe atvirkštinė transkriptazė (50 U/μl), RNazės slopikliai, RNR mėginys ir vanduo be nukleazių sumaišyti, kad reakcijos tūris atitiktų 100μl. Termocikleris nustatytas keturiems parametrams: 1 - 25°C 10 min., 2 - 37°C 120 min., 3- 85°C 5 min., 4 - 4°C. Paruošta kDNA laikyta

-20°C temperatūroje.

#### 4.4. Imunohistocheminis tyrimas

Audiniai fiksuoti formaline ir suformuoti parafino blokai. Audinys supjaustomas mikrotomu 5µM storiu ir užnešamas ant stiklelio. Paliekamas per naktį esant 50°C temperatūrai, kad audinys prisitvirtintų. Toliau vykdoma mėginio deparafinizacija: naudojant tirpalus: Histo-clear (Thermo scientific), 100%, 90%, 70% koncentracijų etanolinius tirpalus. Toliau stikleliai įdedami į 0,01M citrato buferį, kaitinami mikrobangų krosnelėje 600W pajėgumu 5 min ir 400W pajėgumu 5 min. Paliekama atvėsti ir plaunama keturis kartus fosfatinio buferio druskų tirpalu (PBS). Stiklelis su audiniu inkubuojamas per naktį esant 4°C, su antikūniu MBL:LS-A689 (polikloninis triušio antikūnas, prieš – žmogaus antigeną) praskiesto su PBS iki 5µg/ml koncentracijos. Po inkubavimo stiklelis nuplaunamas su PBS, užnešamas antrinis antikūnas iš rinkinio “Universal VECTASTAIN ABC®” (Vector Labs). Stikliukai išryškinti naudojant rinkinį “DAB substrate (Dako)”. Parafino blokai su žmogaus mėginiu atitinka nacionalinio sveikatos instituto JAV reikalavimus. Informacija pateikiama tokiu būdu, kad paciento tapatybė nebūtų atskleista.

#### 4.5. Kiekybinė tikro laiko polimerazės grandininė reakcija

Genų raiška adenozino receptoriams nustatyta taikant kiekybinę tikro laiko polimerazės grandininę reakciją (KTL-PGR), naudojant “TaqMan®” pradmenis ir zondus. Pasirinktas reakcijos mišinys „TaqMan Universal PCR master mix (AB)®“. Reakcijai atlikti naudotas termocikleris „ABI prism 7300“. Vienai reakcijai naudota 5 ng kDNR, 20X pradmenų (galutinė 1X koncentracija 900 nM), 20X zondo (galutinė 1X koncentracija 250nM), 2X reakcijos mišinio, bendras reakcijos tūris 20µl. Termocikleris „ABI prism 7300“ nustatytas tokiems parametrams: išlaikyti 2min 50°C, 10 min 95°C, tada pradėti 40 ciklų: 15 s 95°C, 1 min. 60°C. Lazeriai nustatyti FAM ir ROX spalvoms. Ciklų sulaikymo slenkstį automatiškai nustato programinė įrangą (Applied Biosystems). Rezultatai įvertinti naudojant  $\Delta\Delta CT$  metodą, kaip referentinį geną pasirenkant betą aktiną.

CT- ciklo slenkstis.

$$\Delta CT_{ag(pav.)} = CT_{ag(pav.)} - CT_{ref(ag(pav.))}$$

$$\Delta CT_{ag(cont.)} = CT_{ag(cont.)} - CT_{ref(ag.(cont.))} \quad \Delta\Delta CT = \Delta CT_{ag(pav.)} - \Delta CT_{ag(cont.)}$$

$$\text{Genų raiškos pokytis} = 2^{\Delta\Delta CT}$$

$CT_{ag(pav.)}$  – analizuojamo geno, paveikto mėginio ciklo slenkstis

$CT_{ag(cont.)}$  – analizuojamo geno, kontrolinės grupės ciklo slenkstis

$CT_{ref(ag(pav.))}$  – referentinio geno, paveikto mėginio ciklo slenkstis

$CT_{ref(ag.(cont.))}$  – referentio geno, kontrolinės grupės ciklo slenkstis

$\Delta CT_{ag(pav.)}$  – normalizuotas analizuojamo geno, ciklo pokytis.

$\Delta CT_{ag(cont.)}$  – kontrolinės grupės geno, ciklo pokytis

KTL-PGR taikant „TaqMan®“ pradmenis skiriasi nuo kitų KTL- PGR metodų pvz., taikant SYBR žaliąjį. Principas pagrįstas fluorescenciniu dažų žymėto zondo komplementariu jungimusi prie norimos sekos ir egzonukleazių aktyvumą turinčio polimerazės taikymu.

Pirmas reakcijos žingsnis - DNR denatūravimas prie 95°C. Išardomos dvigrandės DNR struktūros, homogenizuojamas reakcijos mišinys ir aktyvuojama polimerazė, taip pat inaktyvuojami kiti fermentai, pvz., atvirkštinė transkriptazė likusi po kDNR sudarymo.

Po šio etapo pradedama reakcijos, kurios vyksta 40 ciklų.

Pirmas ciklo žingsnis yra kaitinant 15 s 95°C, atkabinti polimerazę nuo DNR grandinės ir atskirti DNR grandines bei homogenizuoti reakcijos mišinį.

Antras etapas trunka 1 min. esant 60°C temperatūrai. Jo metu vyksta hibridizacijos ir elongacijos fazės. Pasirinkti pradmenys jungiasi su vienagrande DNR. Taip pat jungiasi ir fluorescenciniu dažų FAM žymėtas zondas. Jis įsiterpia tarp pradinio ir galinio pradmenų sekos. Prie zondo yra taip pat prisijungęs ne fluorescuojantis, fluorescencijos slopintojas ir MGB priedas, kuris pagerina zondo jungimąsi prie DNR sekos. Paveikus zondą atitinkamo 488 nm bangos ilgio lazerio spinduliu, fluorescencija nevyksta, nes vyksta fluorescencijos sužadintos būsenos rezonansinės energijos perdavimas į fluorescencijos slopintoją, kuris prisijungęs prie zondo 3' gale. Prisijungus pradmenims ir zondui, jungiasi polimerazė, kuri vykdo grandinės elongaciją, sintetinant komplementarią grandinę matricinei DNR. Kadangi „TaqMan®“ polimerazė turi egzonukleazinį aktyvumą, ji suardo zondo ir, fluorescencinio dažo jungtį. Atitrukęs fluorescencinis dažas, neslopinamas ir paveikus atitinkamo bangos ilgio lazerio šviesa, fluorescuoja, o jo signalas aptinkamas detektoriuje.

Priešingai nei taikant SYBR žaliąjį dažą, „TaqMan®“ metodas parodo įvykusių reakcijų skaičių, o ne bendrą susidariusį DNR kiekį. Tai padidina reakcijos specifiškumą, apsaugo nuo nespecifiškai prisijungusių pradmenų, nes šiuo atveju norint gauti fluorescencinį signalą, reikia, kad pradmenys ir zondas būtų prisijungę prie norimo geno sekos. „Applied Biosystems“ kompanija užtikrina pradmenų efektyvumą artimą 100%, todėl galima taikyti  $\Delta\Delta CT$  metodą. Aišku pradmenų efektyvumui gali turėti įtakos užšaldymo, atšildymo procedūros, reakcijos mišinio kokybė, tačiau tai nėra kritinis veiksnys.

Pagrindinis metodo trūkumas yra zondo gamyba, nes skirtingoms sekoms reikalingas skirtingas zondas. Šis veiksnys daro neigiamą įtaką metodo savikainai. [134, 135].

#### 4.6. Ląstelių kultūra

PSKE ir PAE ląstelės gautos iš Pietų Alabamos universiteto, kur jos buvo išskirtos iš žiurkės ir kultivuojamos iki šešto persodinimo. Ląstelių kultūra auga prisitvirtinusi prie indų paviršiaus. Naudojama terpė (paruošta iš Dubecco's modifikuota Eagle's terpės (DMEM)) su gliukoze 4500 mg/l, natrio piruvatu 110mg/l ir L-glutaminu, 10 % FVS, penicilinu (100 V/V per ml), streptomicinu (100 µg/ml). Ląstelės auginamos iki kol pasiekiamas ląstelių monosluoksnis. Atskirti ląsteles nuo flakono sienelės naudojamas 0,25% tripsino-0,02% EDTA tirpalas (Invitrogen). Ląstelių užšaldymui naudotas FVS su 10% DMSO tirpalas. Užšaldymo procedūra vykdyta pirmą dieną perkeliant į -20°C šaldytuvą, kitą dieną perkeliant į -70°C šaldytuvą, po savaitės perkeliant į skystą azotą. Užšaldymui pasirinkta koncentracija 1 milijonas ląstelių viename mililitre.

Vykdam hipoksijos eksperimentą, ląstelės patalpintos į kamerą, kurioje deguonies kiekis 1%, azoto 94%, CO<sub>2</sub> 5%.

#### 4.7. Ląstelių skaičiaus ir gyvybingumo įvertinimas

Endotelio ląstelių gyvybingumas buvo nustatomas, remiantis negyvų ląstelių membranos pralaidumu. Tam naudotas tripano mėlio tirpalas (Gibco). Ląstelių monosluoksnis atskiriamas nuo indo, naudojant 0,25% tripsino-0,02% EDTA tirpalą (Invitrogen). Ląstelės praskiedžiamos, ląstelių suspensija sumaišoma su dažu lygiomis dalimis. Nudažytos ląstelės užnešamos ant hemocitometro ir suskaičiuojamos, naudojant šviesinį mikroskopą. Negyvos ląstelės nusidažo mėlynai. Ląstelių skaičius nustatomas pagal pateiktą formulę. Ląstelių skaičius/1ml = 10000 \* suskaičiuotų ląstelių vidurkis didžiuosiuose kvadratuose. Santykinis gyvybingumas = gyvų ląstelių skaičius/ bendro ląstelių skaičiaus.

#### 4.8. Žiurkių paveikimas hipoksija ir plaučių preparavimas

Sprague Dawley žiurkės patalpintos į hipobarinę kamerą, kuri atitinka pasikėlimą į 18000 pėdų aukštį (5,486 km, 10,5 % deguonies). Gyvūnai paimti analizei po 3, 7 ir 21 dienų. Nustatomas svorio pokytis. Anestezavus izofluranu plaučių arterijos slėgis buvo pamatuotas naudojant plaučių arterijos kateterį. Eksperimento pabaigoje žiurkėms suteikiama narkozė ketamino ir ksilazino mišiniu, plaučiai išimami ir užšaldomi skystame azote. Bandymai su gyvūnais buvo atlikti pagal gyvūnų priežiūros ir saugos komiteto JAV patvirtintus protokolus, 81810(08)1E, 81802007(08)1F.

## 4.9. Statistinė analizė

Statistinė analizė atlikta taikant Student's T testą. Skirtumai laikomi statistiškai patikimais esant  $P$  reikšmei  $\leq 0.05$  ( $n \geq 3$ ). Rezultatai pateikiami naudojant standartinę vidurkio įverčio paklaidą  $\pm$  S.E.M nepriklausomų eksperimentų.  $P$  reikšmės pateiktos simboliais kurie atitinka : \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$  \*\*\*  $< 0.001$ . T-testas atliktas naudojant Microsoft excel programą.

## 4.10. Ląstelių proliferacijos įvertinimas

Į 48 šulinėlių lėkštelę perkelta 4000 PSKE ląstelių ir 400  $\mu$ l terpės, o į 96 šulinėlių lėkštelę perkelta 2000 ląstelių ir 200  $\mu$ l terpės. Po 24val. ląstelės prisitvirtino prie lėkštelės, buvo keičiama augimo terpė į terpę be FVS. Ląstelės paliekamos šioje terpėje be serumo 72val. Ląstelės naudotos iki 15 perkėlimo. Nustatyti adozino receptorių agonistų poveikį ląstelių proliferacijai naudoti šie agonistai: NECA (5'-*N*-Etilkarboksiamidoadozinas) (Tocris bioscience) – adozino analogas, HEMADO (2-(1-heksinil-*N*-metiladozinas)) (Tocris bioscience) selektyvus A3R agonistas, CPA (*N*-Ciklopentiladozinas) (Tocris bioscience) selektyvus A1R agonistas, CV1808 (2-fenilaminoadozinas) (Tocris bioscience) selektyvus A2 adozino receptorių agonistas. Palyginimui naudotas adozinas (Sigma aldrich). Po 72 val. inkubavimo ląstelės paveiktos išvardytų agonistų sekančiomis koncentracijomis:  $10^{-9}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M ir  $10^{-5}$  M. Tada įdedamas  $^3$ H – timidinas ir inkubuota 24val prie 37 ° C ir 5% CO<sub>2</sub>. Vykstant ląstelių proliferacijai  $^3$ H – timidinas įtraukiamas į DNR struktūrą. Po inkubavimo : 1. Pašalinta terpė. 2. Keturis kartus plauta su 1X fosfatinio buferio druskų tirpalu (PBS). 3. Pridėta 200 $\mu$ l 0.2 M perchloro rūgšties. 4. Keturis kartus perplaunam su 1x PBS. 5. Pridėta 1% SDS / 0.01 N NaOH tirpalas. 6. Turinys surenkamas į „Pony“ mėgintuvėlius. 7. Pridedama 1.5 ml „Ecoscint H“ scintiliacinio kokteilio. Bandiniai nuskaityti naudojant Beckman betą dalelių skaitytuvą (programa #6; skaičiavimų per minutę (SPM) 1 minutę kiekvienam mėgintuvėliui). Rezultatai pateikiami naudojant „GraphPad prism“ programą.

## 5. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Adozino receptoriai yra svarbūs žmogaus fiziologiniuose procesuose. Veikiant AR galima sulaukti drąstiškų pokyčių, tai įrodyta AR nokautų modeliais. Taip pat AR poveikį organizmui galima nustatyti, vartojant registruotus vaistinius preparatus, kurie veikia į AR: adozinas, regadozonas, teofilinas. Tačiau norint sustiprinti poveikį ir pasiekti norimą terapinį efektą, reikia veikti selektyviai į adozino receptorių.

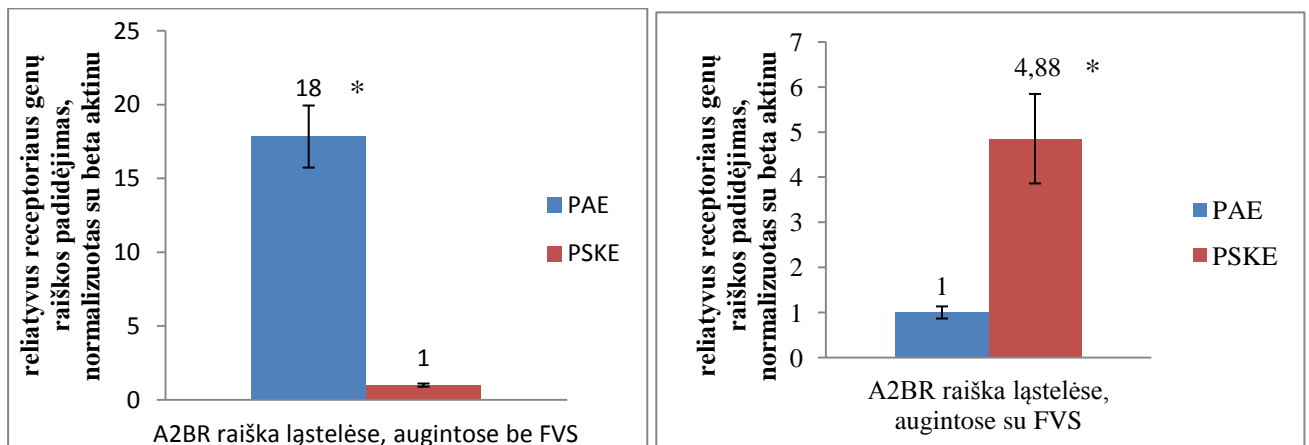
Paskelbta daug mokslinių duomenų apie adenozino receptorių funkcijas. Pastebėta AR receptorių autokrininė reguliacija. Adenozinas greitai inaktyvuojamas fermentų ar pernešamas į ląstelės vidų, o aktyvuoti AR slopina tolesnę jų gamybą [136]. Todėl neužtenka surasti selektyviai ir efektyviai veikiančius ligandus, reikia atsižvelgti ir į receptoriaus raišką ląstelėse.

Šiame darbe buvo tiriama adenozinių receptorių genų raiška (iRNR transkriptai) bei jos pokytis esant hipoksijai (1% deguonies). Pasirinkti du skirtingi plaučių endotelio ląstelių tipai: smulkiųjų kraujagyslių endotelio ir plaučių arterijos endotelio. Taip pat įvertinta AR agonistų įtaka PSKE ląstelių proliferacijai bei žiurkės plaučių AR pokyčiai, esant hipoksijai (10,5% deguonies).

### 5.1. Adenozino receptorių genų raiška plaučių endotelio ląstelėse

AR genų raiška nustatyta taikant KTL-PGR. Prieš pradėdant hipoksijos eksperimentus, įvertinta FVS poveikis adenozino receptorių raiškai. Nustatyta, kad PSKE ląstelės augintos be serumo ir su serumu neturi A1R, A2AR. PAE ląstelėse nebuvo aptiktas A3R.

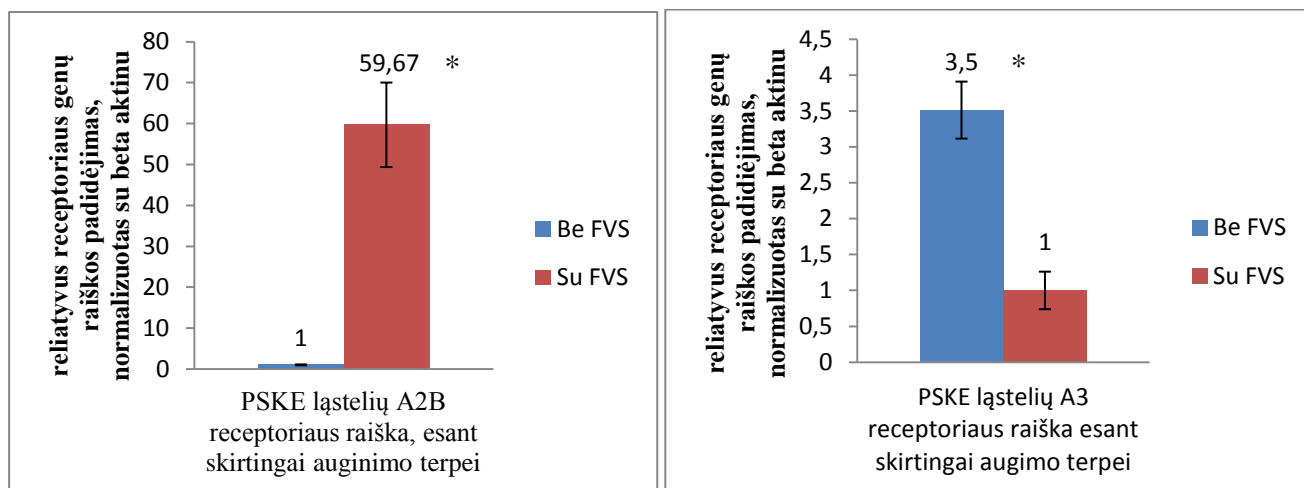
Kadangi vienintelis receptorių, kurio genų raiška vyksta abejuose ląstelėse yra A2BR, palyginta jo genų raiška skirtingose ląstelėse, esant skirtingoms augimo terpėms. A2BR receptoriaus genų raiška PSKE kontrolinės ląstelėse buvo 18 kartų mažesnė, lyginant su PAE kontrolinėmis ląstelėmis auginant terpėje be FVS. Auginant ląsteles terpėje su serumu, nustatyta A2BR genų raiška buvo 4,9 karto didesnė PSKE, nei PAE ląstelėse. (8 pav.)



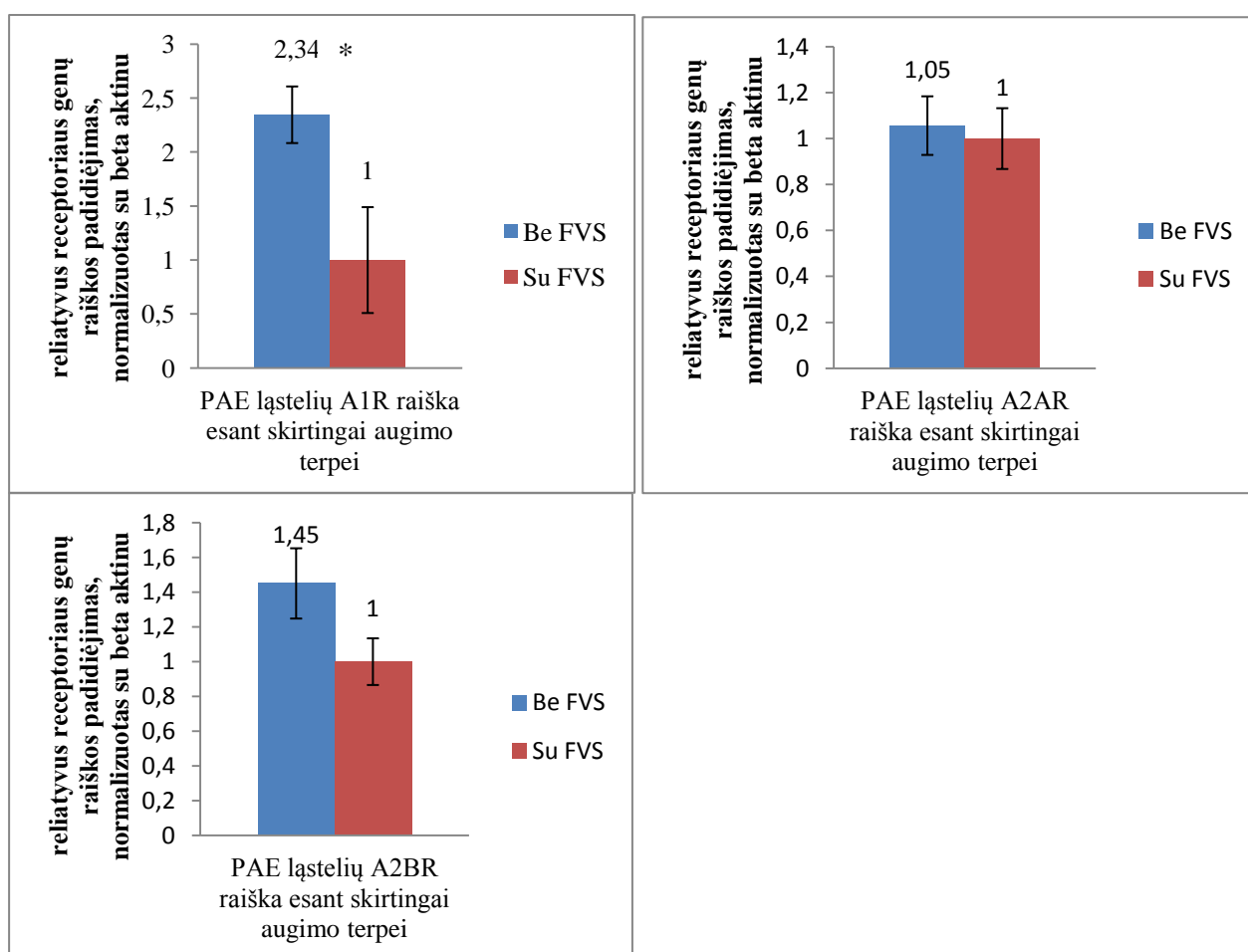
8 pav. A2BR raiška lyginta skirtingose ląstelėse PAE ir PSKE. Auginant skirtingomis terpėmis su FVS (10%) ir be FVS. Analizė atlikta taikant  $\Delta\Delta\text{CT}$  metodą, o mažesnė receptoriaus raiška prilyginama 1.

Lyginant A2BR genų raišką tik PSKE ląstelėse, pastebėta, kad FVS ją padidina net 59,7 karto. A3R genų raiška sumažėja 3,5 karto auginant ląsteles terpėje, kurioje yra serumo (10% FVS) (9pav.). Šie receptorių genų raiškos pokyčiai ląstelėse gali būti siejami su augimo faktoriais, kurių gausu FVS.

Tačiau nustatyti faktorių, kuris daro įtaką šių receptorių raiškos pokyčiams, reikėtų ląsteles veikti išgrynintomis medžiagomis. Taip pat gali būti, kad šiam efektui pasiekti reikalingas ne vienas augimo faktorius, bet jų mišinys, todėl norint išsiaiškinti, kas sukelia šiuos pokyčius, reikėtų atlikti papildomus tyrimus.



9 pav. A2BR ir A3R raiška PSKE ląstelėse auginant jas su FVS (10%) ir be FVS. Analizė atlikta taikant  $\Delta\Delta\text{CT}$  metodą mažesnė receptoriaus raiška prilyginama 1.



10 pav. A1R, A2AR A3R raiška PAE ląstelėse auginant jas terpėje su FVS (10%) ir be FVS. Analizė atlikta taikant  $\Delta\Delta\text{CT}$  metodą mažesnė receptoriaus raiška prilyginama 1.



Vienintelis statistiškai patikimas pokytis PAE ląstelėse auginant skirtingose terpėse buvo A1R raiškos padidėjimas 2,3 karto. A2AR ir A2BR genų raiškai skirtinga augimo terpė neturėjo įtakos.

Priešingai nei PSKE ląstelėse, PAE ląstelėse skirtinga augimo terpė neturėjo didelės įtakos AR receptorių pokyčiams. Atlikus AR genų raiškos analizę pastebėta, kad PSKE ir PAE receptorių raiška skiriasi. Taip pat pastebėta, kad augimo terpės sudėtis daro įtaką receptorių raiškai.

Literatūroje AR genų raiška žiurkės plaučių endotelio ląstelėms nebuvo aprašyta. Mūsų nustatyta skirtinga AR genų raiška ląstelėse prisideda prie šių plaučių endotelio ląstelių diferenciacijos. Yra duomenų, kad žmogaus plaučių arterijos endotelio ląstelės turi A2AR ir A2BR, bet neturi A1R ir A3R [137]. Taip pat yra duomenų, kad žmogaus plaučių smulkių kraujagyslių endotelio ląstelėse A3R turi įtakos reguliuojant fiziologinius procesus. Tai pastebėta stimuliuojant ląsteles selektyviu A3R agonistu [138].

## **5.2. Adenozino receptorių genų raiškos pokyčiai plaučių endotelio ląstelėse esant hipoksijai**

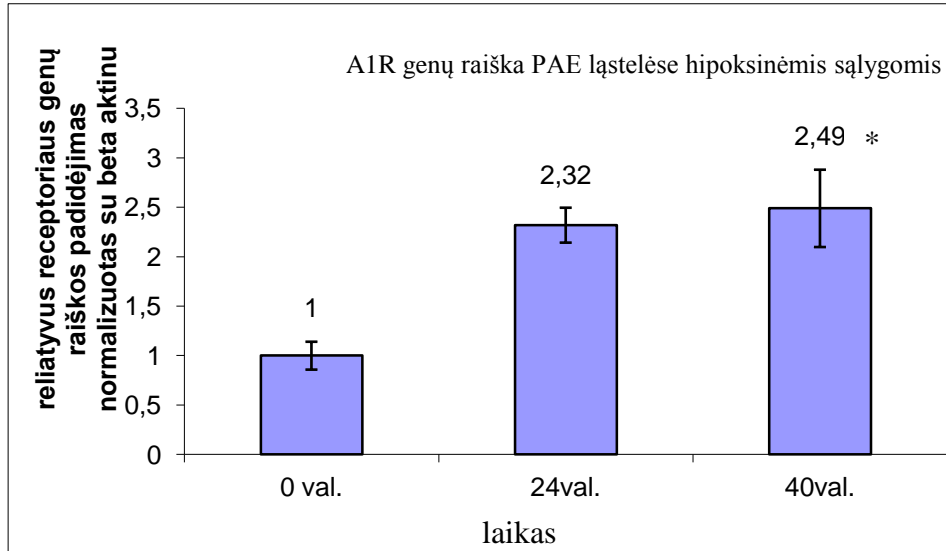
Deguonies kiekis yra svarbus faktorius daugeliui žinduolių organizmo ląstelių. Tačiau reikiamas deguonies tiekimas gali sutrikti dėl patologijos ar pasikeitus aplinkai. Organizmui reaguojant į sumažėjusius deguonies kiekius, keičiasi biocheminiai procesai, naudojami kompensaciniai mechanizmai.

Yra žinoma, kad biocheminiai procesai, susiję su adenozinu, hipoksijos metu pakinta. Jų reguliacija vyksta per AR pokyčius, taip pat kitus adenozino koncentraciją nulemiančius veiksniai: ADA, ektonukleotidazes, ekvilibracinius pernašos baltymus. Kai kurie adenozino receptorių pokyčiai esant hipoksijai yra gerai žinomi, tačiau skirtingų ląstelių tipai, skirtingai reaguoja į deguonies koncentracijos pokyčius.

Šiame darbe atlikta AR genų raiškos pokyčių nustatymas esant vidutinės trukmės hipoksijai (24val.) ir ilgos trukmės hipoksijai (40val.). Taip pat buvo atlikti tyrimai norint išsiaiškinti trumpo (6val.) hipoksijos poveikio įtaką, reguliuojant AR genų raišką, tačiau skirtumų nepastebėta (duomenys neįtraukti).

Veikiant PAE ląsteles hipoksija (1% deguonies) po 24val. pastebėta A1R genų raiškos padidėjimas 2,5 karto, po 40val. šis pokytis išliko ir įgavo statistinį patikimumą. A1R genų raiška PSKE ląstelėse nebuvo pastebėta. Veikiant hipoksijai šio geno indukcija taip pat nepastebėta. (11 pav.) Literatūroje aprašoma A1R receptoriaus padidėjimas DDT1-MF2 lygiųjų raumenų ląstelėse, paveiktose hipoksijos. Receptoriaus padidėjimas siejamas su radioaktyviu izotopu (tričiu) žymėto <sup>3</sup>H-DPCPX selektyvaus A1R antagonistu padidėjusiu jungimusi prie lygiųjų raumenų ląstelių, esant

hipoksijai [139]. Šiuo atveju nurodomas padidėjęs A1R baltymo kiekis. Mūsų atlikto eksperimento atveju nurodoma tik padidėjęs iRNR A1R koduojančio baltymo kiekis, tačiau baltymo kiekis nebuvo nustatytas. Literatūroje neaptikta duomenų apie A1R receptoriaus padidėjimą hipoksijos metu endotelio ląstelėse.

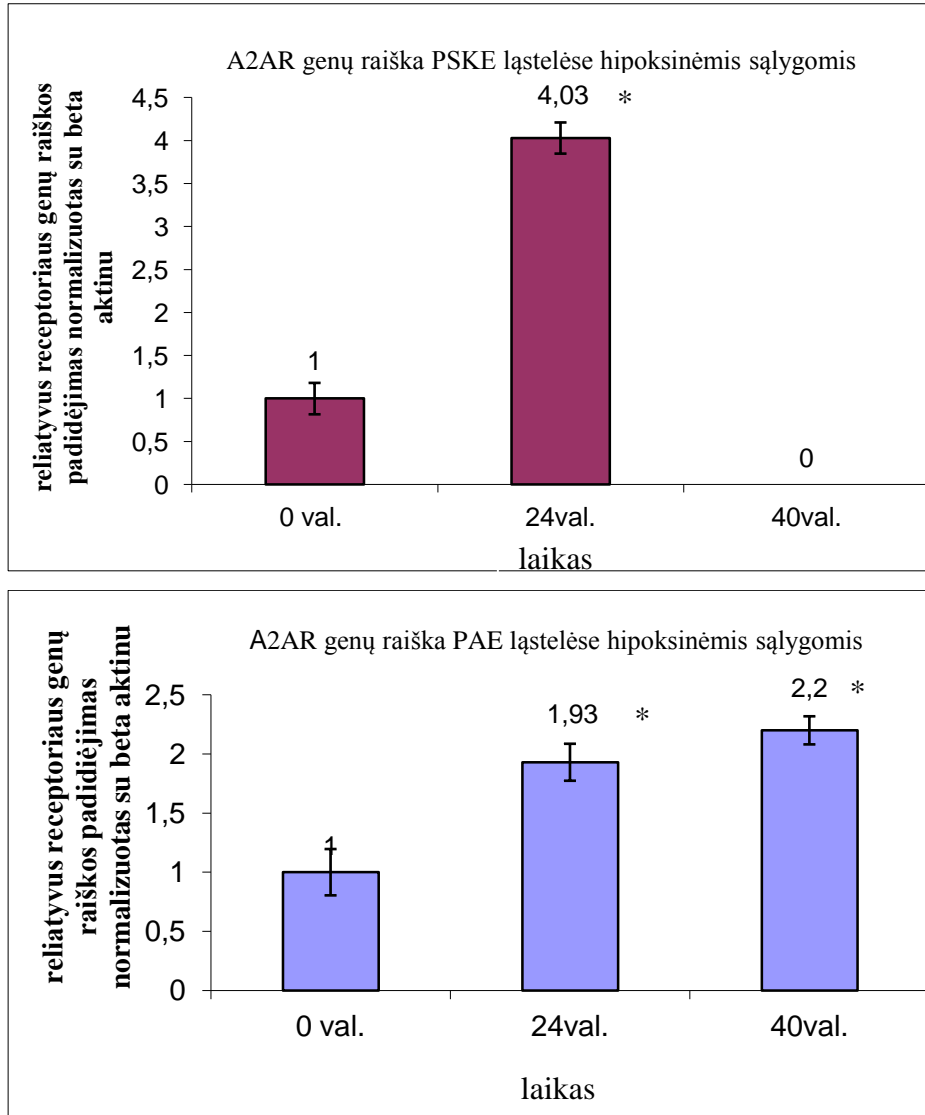


11 pav. A1R genų raiška PAE ląstelėse esant hipoksijai (1% deguonies) po 24val. ir 40val. Kontrolė veikiama Denverio aukštumos sąlygomis ( atmosferos dujų sudėtis 1,6 km aukštyje, 17,2 % deguonies), reliatyviai suliyginta su 1.

A2AR raiškos pokyčiai pastebėti abejose ląstelių tipuose. Įdomu tai, kad A2AR genų raiška PSKE ląstelėse nepastebėta, auginant ląsteles be FVS po 6val. ir po 40val. Taip pat receptoriaus genų raiška nepastebėta auginant ląsteles su 10% FVS. A2AR indukuotas PSKE ląstelėse po 24 val. hipoksijos. PAE ląsteles veikiant hipoksijai A2AR genų raiška statistiškai patikimai padidėjo du kartus po 24 val., šis pokytis išliko po 40 val. (12 pav.)

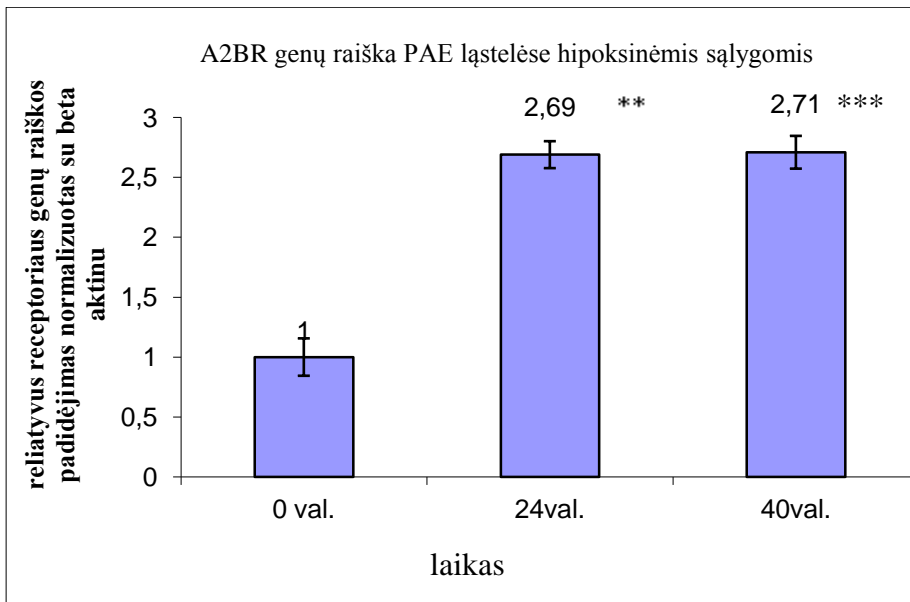
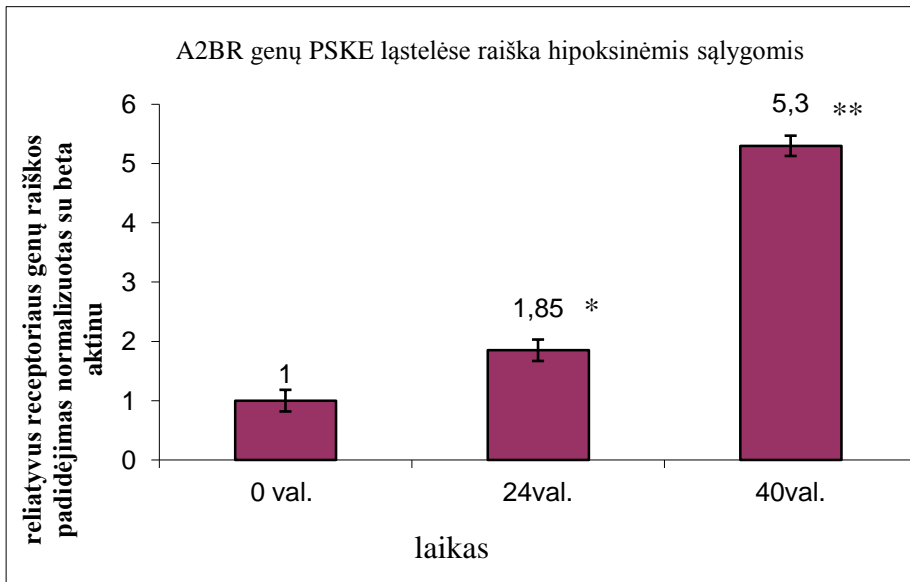
A2AR vaidina svarbų vaidmenį endotelio ląstelėse. Veikiant į A2AR selektyviais agonistais padidėja NO išskyrimas, ląstelių proliferacija. Taip pat pastebėta, kad atyvuojant A2AR slopinamas antiangiogeninis matricos baltymas trombospondinas-1, tokiu būdu skatinama angiogenezė [140]. NO išsiskyrimas, ląstelių proliferacija ir angiogenezė pastebėti hipoksijos metu. Taip pat manoma, kad A2AR daro įtaką šiems pokyčiams. Naujausiais duomenimis įrodyta, kad plaučių endotelio ląstelėse A2AR hipoksijos metu yra indukuojamas, dalyvaujant hipoksijos indukuojamam transkripcijos faktoriui HIF-2 $\alpha$ , o ne HIF-1 $\alpha$ . Užslopinus HIF-2 $\alpha$  veiklą ir esant hipoksijai, nepastebima A2AR indukcija. Taip pat autoriai nurodo, kad plaučių endotelio ląstelės, stimuliuotos per A2AR receptorių, turi angiogenezinį potencialą, pasireiškiantį: padidėjusia ląstelių proliferacija, ląstelių migravimu ir vamzdelio formavimu [141]. Pastebėta, kad A2AR raiška padidėja

feochromocitomos (neuroendokrinio tumoro (PC12)) ląstelėse, esant hipoksijai. Autoriai mano, kad A2AR padidėjimas reguliuojamas grįžtamu mechanizmu ir susijęs su receptoriaus apsauginiu aktyvumu, nes slopinamas kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus išskyrimas, o šis faktorius glaudžiai susijęs su angiogeneze [142]. Panašu, kad A2AR vaidmuo skirtinguose ląstelių tipuose skiriasi.



12 pav. A2AR genų raiška PAE ir PSKE ląstelėse esant hipoksijai (1% deguonies) po 24 val. ir po 40 val., esant 1% hipoksijai. Kontrolė veikiama Denverio aukštumos sąlygomis (atmosferos dujų sudėtis 1,6 km aukštyje, 17,2 % deguonies), reliatyviai sulyginta su 1.

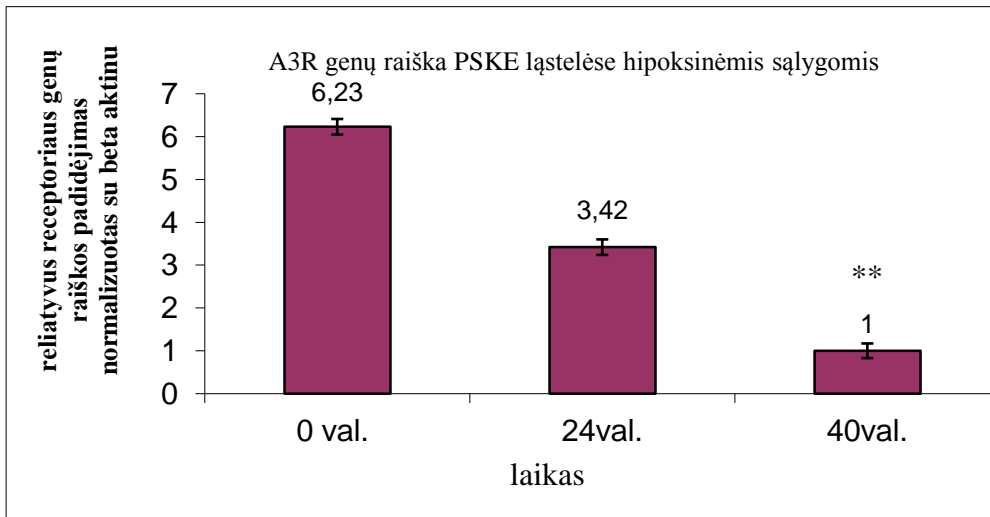
Kaip ir tikėtasi, A2BR genų raiška yra indukuojama hipoksijos. A2BR genų raiška ir baltymo kiekio padidėjimas yra pastebimas daugelyje ląstelių tipų. Iš visos AR grupės, A2BR yra priskiriamas hipoksijos indukuojamam. Mechanizmas pagrįstas hipoksijos indukuojamo faktoriaus HIF-1 $\alpha$  veikimu. Susidarius hipoksinėms sąlygoms, aktyvuojamas HIF-1 $\alpha$  [49]. HIF-1 $\alpha$  jungiasi prie A2BR geno promotoriaus regiono ir pradeda jo transkripciją. PAE ir PSKE ląstelėse po 24val. A2BR genų raiška padidėjo 2,7 karto ir 1,9 karto, o po 40 val. 2,7 ir 5,3 karto atitinkamai. (13 pav.)



13 pav. A2BR genų raiška PAE ir PSKE ląstelėse esant hipoksijai (1% deguonies) po 24h ir 40h, esant 1% hipoksijai. Kontrolė veikiama Denverio aukštumos sąlygomis (atmosferos dujų sudėtis 1,6 km aukštyje, 17,2 % deguonies), reliatyviai sulyginata su 1.

A3R genų raiška nepastebėta PAE ląstelėse esant skirtingoms sąlygoms: kontrolinėse grupėse su FVS ir be, bei esant hipoksijai. Tačiau PSKE genų raiška veikiant hipoksijai, pasikeitė po 24 val. krito 1,8 karto, o po 40 val. krito 6,2 karto. (14 pav.)

Nors nėra daug duomenų apie A3R genų raišką PSKE ląstelėse, tačiau atlikti bandymai su žmogaus PSKE ląstelėmis parodo, kad aktyvuojant selektyviu A3R agonistu stabdomas F-aktino traukliųjų pluoštų (*angl. stress fibers*) susidarymas. Šis procesas siejamas su citoskeleto pokyčiais, kurie galimai turi įtakos endotelio pralaidumui [138]. Remiantis šiais duomenimis, galima iškelti hipotezę, kad A3R sumažėjimas PSKE ląstelėse padidina endotelio pralaidumą esant hipoksijai. Tačiau ši hipotezė turi būti įrodyta eksperimentais.



14 pav. A3R genų raiška PSKE ląstelėse esant hipoksijai (1% deguonies) po 24 val. ir 40 val. esant 1% hipoksijai. Kontrolė veikiama Denverio aukštumos sąlygomis (atmosferos dujų sudėtis 1,6 km aukštyje, 17,2 % deguonies), reliatyviai sulyginta su 1.

### 5.3. Adenozino receptorių agonistų įtaka plaučių endotelio ląstelių proliferacijai

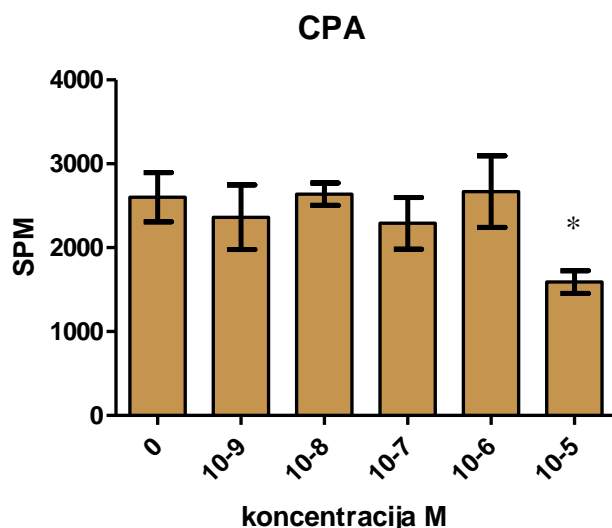
Vienas iš PAH patogenezėje dalyvaujančių veiksnių yra plaučių kraujagyslių endotelio hiperproliferacija. Manoma, kad dėl endotelio proliferacijos sumažėja kraujagyslių spindis ir padidėja slėgis plaučių kraujagyslėse. Taip pat pastebėta, kad pacientų, sergančių PAH, kraujagyslių pažaidos vietose pastebima endotelio hiperproliferacija [10, 143]. Pasirinkta nustatyti PSKE proliferacijos priklausomybę nuo AR, veikiant juos selektyviais agonistais. Ląstelių proliferacijos priklausomybės įvertinimui, ląstelės įvestos į ramybės būseną. Tai pasiekta, pakeitus terpę, kurioje nėra FVS ir inkubuojant 72 val.

Ląstelių proliferacijos nustatymu, pasirinktas tričiu žymėto timidino metodas. Šis metodas pasižymi jautrumu, nes nustatomas ne bendras ląstelių skaičius, bet susidariusių naujų ląstelių skaičius. Visuose bandymuose įtraukta DMSO kontrolė.

PSKE ląstelėse nepastebėta A1R genų raiška, tačiau nuspręsta tikrinti visų receptorių atsaką į jiems specifinius agonistus. Tokiu būdu atliekamas genų raiškos duomenų patikrinimas. A1R agonistu pasirinktas daugelyje *in vitro* eksperimentų naudotas agonistas CPA – (N-ciklopentiladenosinas). Žinoma, kad giminingumas ir efektyvumas receptoriui skiriasi tarp skirtingų rūšių, todėl pasirinkta keletas agonisto koncentracijų. Deja, didelių koncentracijų negalėjome patikrinti, nes daugelis agonistų ribotai tirpsta DMSO, o pasiekti  $10^{-3}$  ir  $10^{-4}$  koncentracijas reikia didelio DMSO kiekio.

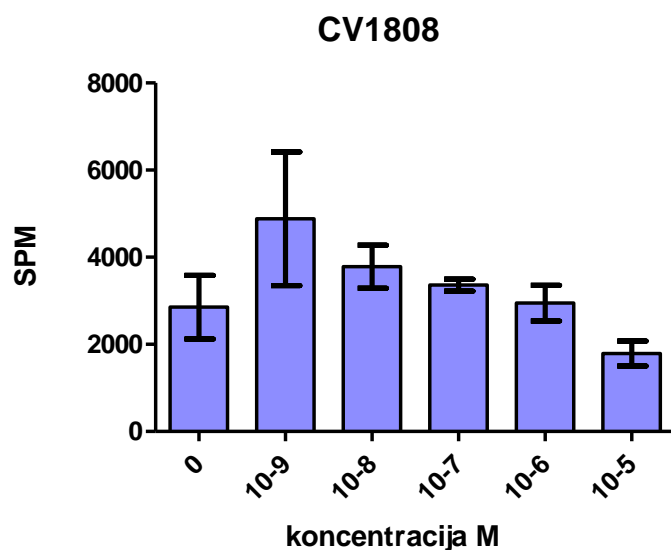
A1R stimuliuotas su selektyviu agonistu CPA 24 val., bet statistškai patikimų proliferacijos požymių nepastebėta, išskyrus proliferacijos slopinimą, esant  $10^{-5}$ M koncentracijai. Ši koncentracija

yra palyginti didelė, o CPA selektyvumas yra ribotas. Manoma, kad esant tokiai koncentracijai, CPA veikia ir kitus adenozino receptorius. Buvo pastebėta, kad esant didelei koncentracijai, CPA veikia A3R kaip antagonistas [77]. Žinant, kad A3R agonistas HEMDO padidina ląstelių proliferaciją, galima suformuoti hipotezę, kad veikiant A3R antagonistais bus stabdoma PSKE ląstelių proliferacija. Ši hipotezė, gali būti įrodoma veikiant selektyviu A3R antagonistu.



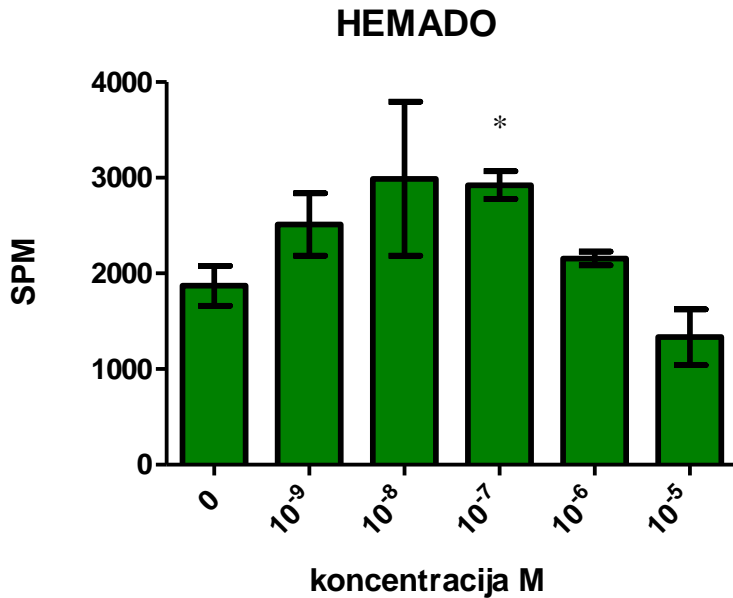
14 pav. PSKE ląstelių proliferacija, esant skirtingoms A1R agonisto koncentracijoms

A2AR raiška taip pat nebuvo pastebėta PSKE ląstelėse. A2BR raiška ne hipoksijos sąlygomis buvo nedidelė. Šių receptorių proliferacijos potencialui nustatyti buvo pasirinktas tik šiems receptoriams selektyvus agonistas CV-1808 2-fenilaminoadenosinas. Nepastebėta, jokių statistiškai patikimų pokyčių, kurie patvirtina, kad esant normalioms sąlygoms, ląstelių proliferacijai šie receptoriai neturi įtakos. Nėra aišku, kaip agonistas paveiktų ląstelių proliferaciją esant hipoksijai, kai A2AR ir A2BR kiekis padidėja keletą kartų.



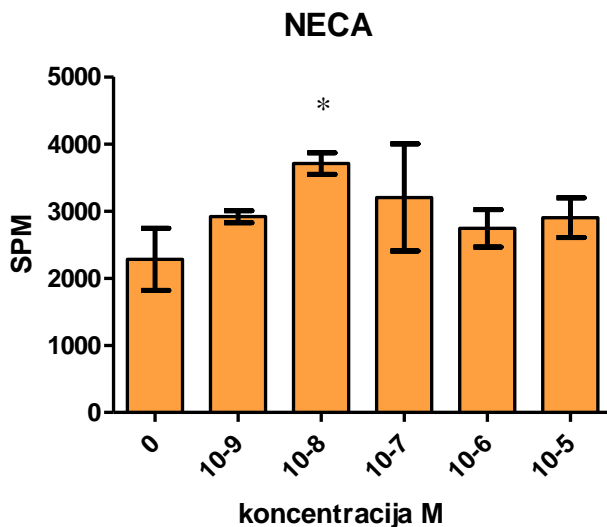
15 pav. PSKE ląstelių proliferacija, esant skirtingoms A2AR ir A2BR agonisto koncentracijoms

HEMADO neseniai surastas selektyvus A3R agonistas. PSKE ląstelėse nustatyta A3R genų raiška. Atlikus proliferacijos eksperimentą naudojant HEMADO pastebėta, kad esant koncentracijoms  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M, ląstelių proliferacija padidėja 1,5 karto. (16 pav.) Naudojant 48 šulinėlių lėkšteles esant  $10^{-7}$  M koncentracijai gautas statistinis patikimumas. Naudojant 96 šulinėlių lėkštelės, pastebėtas statistinis patikimumas, esant  $10^{-8}$  M molių koncentracijai.



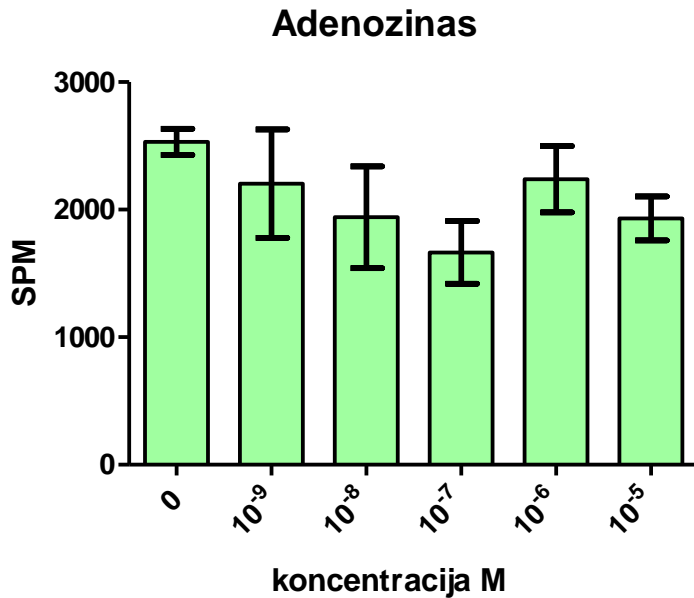
16 pav. PSKE ląstelių proliferacija kreivė esant skirtingoms A3R agonisto koncentracijoms

NECA - neselektyvus adenozino analogas. Jo giminingumas panašus į adenozino, tačiau jis atsparesnis ektonukleotidazių poveikiui. Ilgą laiką NECA naudotas kaip selektyvus A3R agonistas. Mūsų atliktame ląstelių proliferacijos eksperimente, NECA, esant  $10^{-8}$  M koncentracijai, padidina ląstelių proliferaciją 1,5 karto (17 pav.). Manoma, kad NECA jungiasi prie A3R, tokiu būdu skatina ląstelių proliferaciją.



17 pav. PSKE ląstelių proliferacija, esant skirtingoms neselektyvaus agonisto koncentracijoms

Taip pat atlikta proliferacijos eksperimentas su adenzinu. Tačiau statistiškai patikimų pokyčių negauta. Manoma, kad dėl trumpo adenzino gyvavimo pusperiodžio neperduodamas signalas receptoriams, todėl nepastebimas efektas. Daugelyje *in vitro* bandymų tikintis ilgesnio efekto, dažniausiai pasirenkamas neselektyvus adenzino receptorių agonistas NECA, kuris yra metaboliškai stabilesnis.



18 pav. PSKE ląstelių proliferacija kreivė esant skirtingoms natūralaus agonisto koncentracijoms

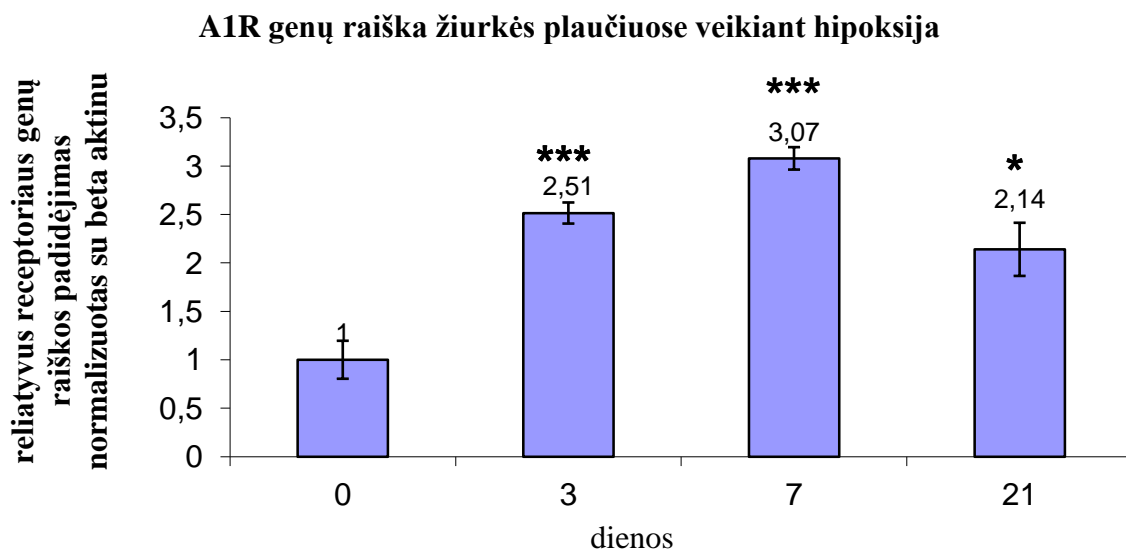
#### **5.4. Adenzino receptorių genų raiškos pokyčiai žiurkių plaučiuose, esant hipoksinėms sąlygomis**

Aukštumų ligą sukeliantis veiksnys yra hipoksija. Taikant eksperimentinį modelį žiurkės patalpinamos į hipobarinę kamerą, kur hipoksijos lygis atitinka sąlygoms esant 5,486 km virš jūros lygio, o deguonies kiekis siekia apie 10,5%. Žiurkėms per tris savaites išsivysto PAH. Esant šioms sąlygoms padidėja endotelio-1, angiotenzino-II gamyba, tai sąlygoja kraujagyslių susitraukimą ir padidėjusį plaučių arterijos slėgį. Tuo tarpu vazodilatatorių prostaciklino ir NO sintezė sumažėja. Hipoksija taip pat veikia ir plaučių lygiuosius raumenis, sumažėja įtampos reguliuojamų  $K^+$  kanalų, kas sąlygoja membranos depoliarizaciją ir pakitusius signalo perdavimo mechanizmus [144]. Esant ilgesniam hipoksijos poveikiui žiurkių plaučiuose, įvyksta kraujagyslių pokyčiai, pasižymintys padidėjusiu lygiųjų raumenų kiekiu apie kraujagysles. Tai pastebima atlikus imunohistocheminę analizę, veikiant selektyviu antikūniu prieš lygiųjų raumenų aktiną. Padaugėja fibroblastų ir miofibroblastų aplink kraujagysles, kuriuose gaminama kolagenas, elastinas ir fibronektinas. Šie faktoriai padaro kraujo indus standžius, kraujagyslės praranda elastingumą.



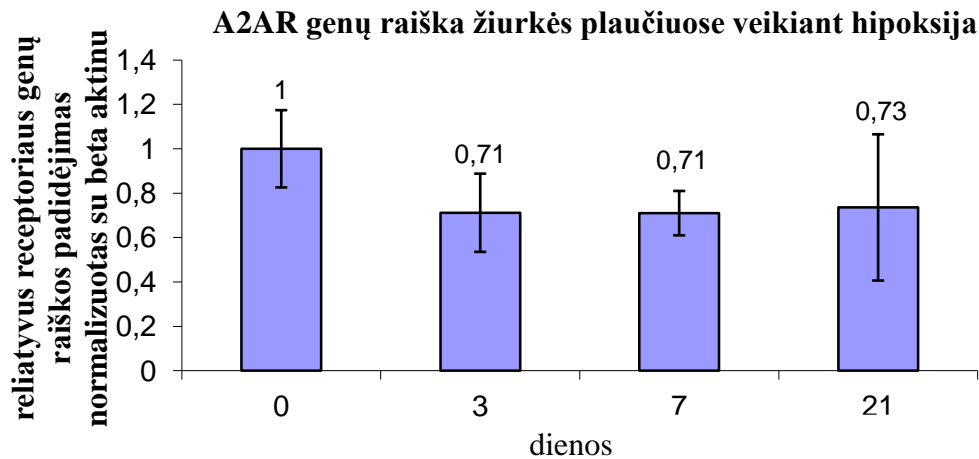
Mūsų taikytame PAH žiurkių modelyje pastebėtas lygiųjų raumenų aktino padidėjimas. Taip pat po trijų savaitių žiurkėms statistiškai patikimai 25% krito svoris. Išsivystė dešiniojo skilvelio hipertrofija, o plaučių arterijos slėgis padidėjo iki 32mmHg lyginant su kontroline grupe - 18mmHg. Šie parametrai patvirtino, kad žiurkėms sukelta PAH. Išskyrus iš kontrolinės grupės ir paveiktos grupės plaučius, nustatyta AR genų raiška.

Po 3 dienų pastebėtas A1R genų raiškos padidėjimas, statistiškai patikimai 2,5 karto. Po 7 dienų receptoriaus ekspresija išliko padidėjus hipoksijos paveiktose žiurkėse, statistiškai patikimai 3 kartus. Po trijų savaitių A1R padidėjimas hipoksijos grupėje išliko, statistiškai patikimai 2,1 karto.



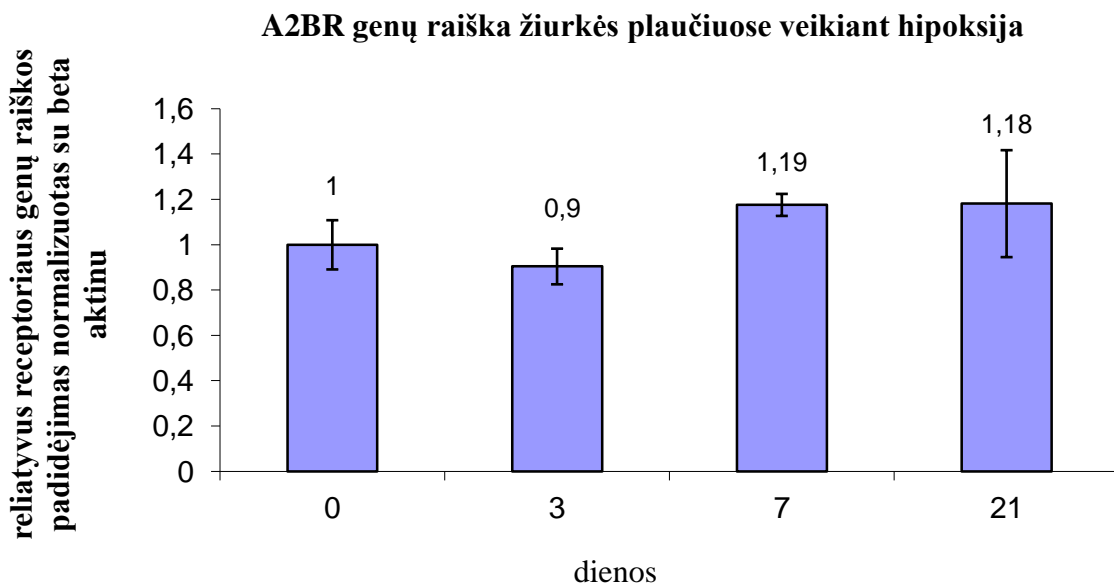
19 pav. A1R genų raiškos pokyčiai žiurkės plaučiuose veikiant aukštumų hipoksija (10.5% deguonies).

Literatūros duomenimis A1R pasižymi apsauginiu veikimu daugeliui organų, esant išeminei reperfuzijai. Padidėjusių genų raišką plaučiuose po hipoksijos galima sieti su natūraliu organizmo adaptaciniu mechanizmu, esant deguonies stygiui. Literatūroje aptiktų tyrimų duomenimis A1R agonistai apsaugo nuo plaučių išeminės reperfuzijos sukeltos edemos bei TNF- $\alpha$  kiekio padidėjimo [145]. Taip pat neseniai paskelbti duomenys, kad A1R agonistas CPA, stabilus adenozino analogas NECA ir adenozinas apsaugo nuo aukštumų sukeltos hipertenzijos. Šie adenozino receptorių agonistai statistiškai patikimai sumažina plaučių arterijos slėgį esant aukštumų hipoksijai. Tačiau CPA neįtakoja proliferuojančių ląstelių branduolio antigeno (PCNA) kiekio padidėjimo ir kraujagyslių sienelių sluoksnio stambėjimo lyginant su adenzinu ir NECA, kurie statistiškai patikimai sumažino šiuos faktorius [146].



20 pav. A2AR genų raiškos pokyčiai žiurkės plaučiuose, veikiant hipobarine hipoksija (10.5% deguonies).

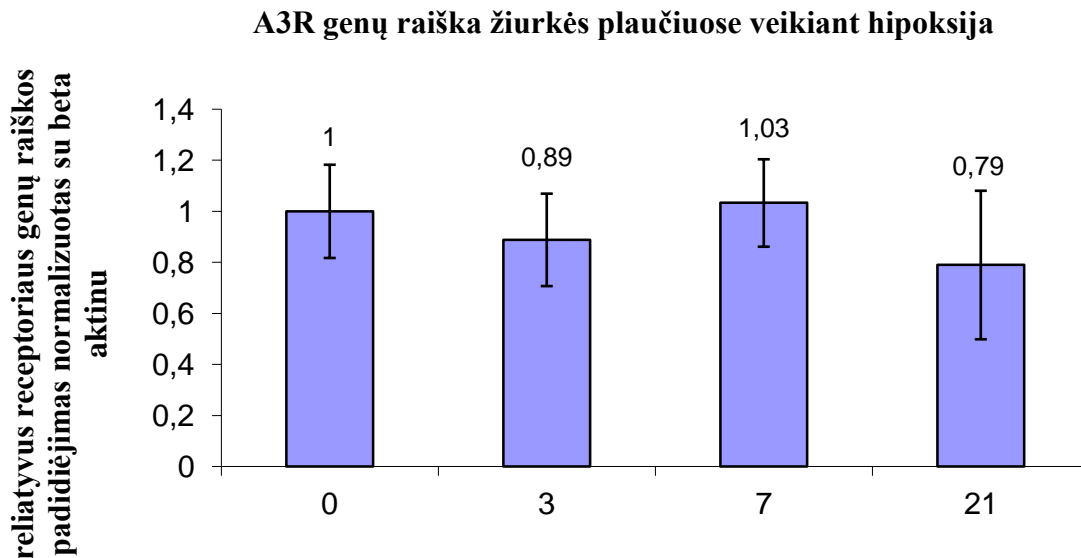
A2AR pokyčių per visą hipoksijos laiką nepastebėta. Paskutiniaisiais literatūros duomenimis, A2AR nokauto pelėms po dviejų savaičių hipoksijos (10,5% deguonies) išsivystė PAH, kuris pasireiškė padidėjusiu plaučių arterijos slėgiu [7]. Tačiau reikia atkreipti dėmesį, kad A2AR nokautas yra viso gyvūno, o ne plaučių ar kito organo. Mūsų rezultatai nerodo receptoriaus pokyčių esant hipoksijai, bet tai nereiškia, kad šis receptorių nėra svarbus PAH patogenezėje.



21 pav. A2BR genų raiškos pokyčiai žiurkės plaučiuose, veikiant hipobarine hipoksija (10.5% deguonies).

A2BR pokyčių per visą hipoksijos laiką nepastebėta. Šie duomenys nustebino, nes A2BR yra indukuojamas hipoksijos. Šių pokyčių nebuvimą galima paaiškinti tuo, jog buvo imamas viso plaučio

audinys, o ne išskiriamos specifinės ląstelės. Todėl A2BR raiška nebūtinai gali padidėti visose ląstelėse, o jeigu dalyje ląstelių ji nepadidėja, tai sumažina ląstelių, kuriose receptoriaus padidėjo, pastebimus pokyčius. Literatūros duomenimis, A2BR panaikinimas arba jo slopinimas sumažina kraujagyslių pokyčius PAH (sukelta Bleomicino) atveju. Apsauginis mechanizmas aiškinamas citokino IL-6 ir endotelino-1 išskyrimo sumažėjimu, galimai turi įtakos plaučių kraujagyslių pokyčiams [8].

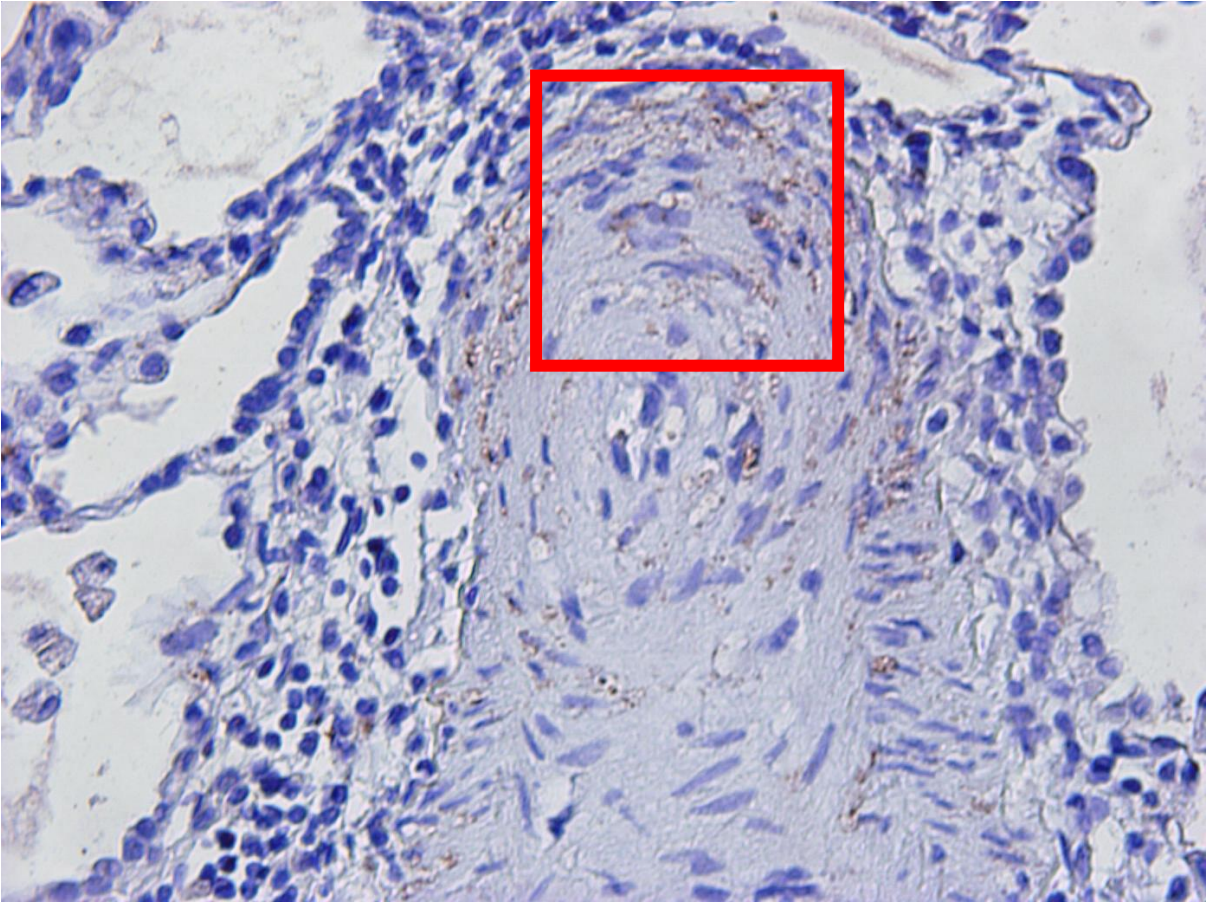


22 pav. A3R genų raiškos pokyčiai žiurkės plaučiuose, veikiant hipobarine hipoksija (10.5% deguonies).

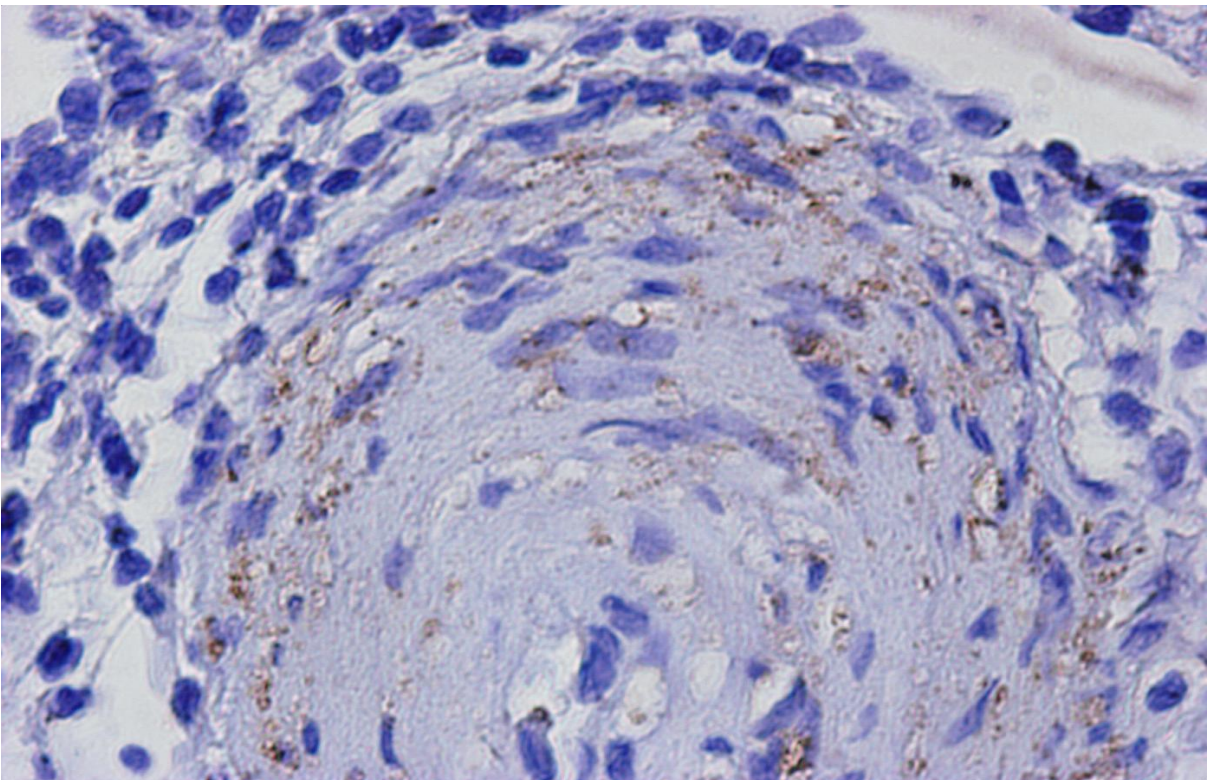
A3R pokyčiu, per visą hipoksijos laiką nepastebėta. Literatūroje duomenų, tiesiogiai susijusių su A3R ir PAH, neatrasta. Pastebėta, kad aktyvavus smegenyse esančius A3R, krenta kraujo spaudimas, bet nepakinta širdies susitraukimų dažnis [147].

### 5.5. A3R raiška PAH pacientų plaučiuose

Atlikus vieno iš PAH pacientų imunohistocheminę analizę, taikant A3R antikūnį, pastebėta, kad antikūnas jungiasi specifiskai prie kraujagyslių okliuzijos vietų, kur susidaro taip vadinami „plexiform lesions“ [148]. Galima daryti išvadą, kad A3R dalyvauja ligos patogenezėje. Formuojama nuomonė, kad kraujagyslių pakitimai esant PAH atveju siejami su plaučių mažų kraujagyslių ląstelių supiktybėjimu [149]. Mechanizmas aiškinamas nuolat aktyvuojamu transkripcijos faktorium (STAT3), o tai yra būdinga vėžinėms ląstelėms. Mūsų atveju plaučių pažaidos vietose rasta A3R baltymų raiška. A3R raiška dažniausiai siejama su vėžinėmis ląstelėmis, kuriose ji būna padidėjusi [150]. Taip pat pastebėta, kad veikiant į vėžinių ląstelių A3R, galima reguliuoti jų proliferaciją.



23 pav.PAH, paciento plaučių sekcijos imunohistocheminis, tyrimas taikant A3R antikūnį 40x padidinimas.



24 pav. PAH, paciento plaučių sekcijos imunohistocheminis tyrimas, taikant A3R antikūnį 100x padidinimą

## 6. IŠVADOS

1. Nustatyta adenožino receptorių genų raiška PAE ir PSKE ląstelėse. PAE ląstelėse A3R geno raiška neaptikta. PSKE ląstelės A1R ir A2AR genų raiška neaptikta.

2. PAE ląstelėse esant hipoksijai (1% deguonies) A1R po 40 val. statistiškai patikimai padidėjo 2,5 karto  $p \leq 0,05$ ; A2AR statistiškai patikimai padidėjo po 24 val. 1,9 karto  $p \leq 0,05$ , po 40 val. 2,2 karto ir įgijo didesnį statistinį patikimumą  $P \leq 0,01$ , A2BR statistiškai patikimai padidėjo 2,7 karto po 24 val. ir išliko padidėjęs po 40 val.  $P \leq 0,01$ . PSKE ląstelėse esant hipoksijai (1% deguonies) indukuotas A2AR, kuris lyginant su kontrole po 24 val., statistiškai patikimai padidėjo 4 kartus  $p \leq 0,05$ , A2BR po 24 val. statistiškai patikimai padidėjo 1,9 karto  $P \leq 0,01$ , o po 40 val. – 5,3 karto  $P \leq 0,01$ , A3R po po 24 val. sumažėjo 1,8 karto, o po 40 val. statistiškai patikimai sumažėjo 6,2 karto  $P \leq 0,01$ .

3. Ištyrus selektyvių agonistų įtaką PSKE ląstelių proliferacijai nustatyta, kad CPA(A1R), adenožinas, CV1808 (A2AR,A2BR), neturi įtakos ląstelių proliferacijai, išskyrus CPA(A1R), kuris slopina ląstelių proliferaciją esant  $10^{-5}$  M koncentracijai. Selektivus A3R agonistas HEMADO statistiškai patikimai padidino ląstelių proliferaciją esant  $10^{-7}$  M 1,5 karto. Neselektivus adenožino receptorių agonistas NECA padidino ląstelių proliferaciją esant  $10^{-8}$  M koncentracijai.

4. Paveikus žiurkes hipobarine hipoksija (10,5% deguonies), pastebėta tik A1R genų raiškos padidėjimas. Po 3 dienų A1R genų raiška statistiškai patikimai padidėjo 2,5 karto  $p \leq 0,001$ , po 7 dienų 3,1 karto  $p \leq 0,001$ , po 21 dienos 2,1 karto  $p \leq 0,05$ . Kitų adenožino receptorių pokyčių nepastebėta.

5. Atlikus imunohistocheminį tyrimą PAH paciento plaučių mėginiui, nustatyta A3R raiška kraujagyslių okliuzijos vietose.

## 7. REKOMENDACIJOS

Magistriniame darbe adenožino receptorių genų raiška nustatyta iRNR lygmeniu.

Tolimesniuose tyrimuose reikėtų nustatyti adenožino receptorių baltymų pokyčius. Imunoblotingas yra vienas iš būdų baltymų pokyčiams nustatyti. Adenožino receptorių įtaka ląstelių proliferacijai įvertinta juos veikiant AR agonistais. Tolimesniuose tyrimuose reikėtų nustatyti AR antagonistų poveikį ląstelių proliferacijai.

## 8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Qureshi AU, Hyder SN, Sheikh AM, Sadiq M. Optimal dose of adenosine effective for supraventricular tachycardia in children. *J Coll Physicians Surg Pak* 2012;22(10):648-51.
2. DiMarco JP, Miles W, Akhtar M, et al. Adenosine for paroxysmal supraventricular tachycardia: dose ranging and comparison with verapamil. Assessment in placebo-controlled, multicenter trials. The Adenosine for PSVT Study Group. *Annals of internal medicine* 1990;113(2):104-10.
3. Mohiuddin SM, Gupta NC, Esterbrooks DJ, et al. Thallium-201 myocardial imaging in patients with coronary artery disease: comparison of intravenous adenosine and oral dipyridamole. *The Annals of pharmacotherapy* 1992;26(11):1352-7.
4. Zuo XR, Zhang R, Jiang X, et al. Usefulness of intravenous adenosine in idiopathic pulmonary arterial hypertension as a screening agent for identifying long-term responders to calcium channel blockers. *The American journal of cardiology* 2012;109(12):1801-6.
5. Fullerton DA, Jones SD, Grover FL, McIntyre RC, Jr. Adenosine effectively controls pulmonary hypertension after cardiac operations. *The Annals of thoracic surgery* 1996;61(4):1118-23; discussion 23-4.
6. Morgan JM, McCormack DG, Griffiths MJ, Morgan CJ, Barnes PJ, Evans TW. Adenosine as a vasodilator in primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1991;84(3):1145-9.
7. Xu MH, Gong YS, Su MS, et al. Absence of the adenosine A2A receptor confers pulmonary arterial hypertension and increased pulmonary vascular remodeling in mice. *Journal of vascular research* 2011;48(2):171-83.
8. Karmouty-Quintana H, Zhong H, Acero L, et al. The A2B adenosine receptor modulates pulmonary hypertension associated with interstitial lung disease. *Faseb J* 2012;26(6):2546-57.
9. Saadjian AY, Paganelli F, Gaubert ML, Levy S, Guieu RP. Adenosine plasma concentration in pulmonary hypertension. *Cardiovascular research* 1999;43(1):228-36.
10. Tudor RM, Voelkel NF. Plexiform lesion in severe pulmonary hypertension: association with glomeruloid lesion. *The American journal of pathology* 2001;159(1):382-3.
11. Jamnikar Ciglenecki U, Grom J, Toplak I, Jemersic L, Barlic-Maganja D. Real-time RT-PCR assay for rapid and specific detection of classical swine fever virus: comparison of SYBR Green and TaqMan MGB detection methods using novel MGB probes. *Journal of virological methods* 2008;147(2):257-64.
12. Zhang R, Xie X. Tools for GPCR drug discovery. *Acta pharmacologica Sinica* 2012;33(3):372-84.

13. Lundstrom K. An overview on GPCRs and drug discovery: structure-based drug design and structural biology on GPCRs. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 2009;552:51-66.
14. Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 1986;321(6065):75-9.
15. Kobilka BK, Dixon RA, Frielle T, et al. cDNA for the human beta 2-adrenergic receptor: a protein with multiple membrane-spanning domains and encoded by a gene whose chromosomal location is shared with that of the receptor for platelet-derived growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84(1):46-50.
16. Dixon RA, Sigal IS, Candelore MR, et al. Structural features required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor. *The EMBO journal* 1987;6(11):3269-75.
17. Hausch F, Holsboer F. *The Seven Pillars of Molecular Pharmacology: GPCR Research Honored with Nobel Prize for Chemistry*. *Angewandte Chemie (International ed)* 2012.
18. Drury AN, Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of physiology* 1929;68(3):213-37.
19. Schenone S, Brullo C, Musumeci F, Bruno O, Botta M. A1 receptors ligands: past, present and future trends. *Current topics in medicinal chemistry* 2010;10(9):878-901.
20. Suzuki T, Namba K, Yamagishi R, Kaneko H, Haga T, Nakata H. A highly conserved tryptophan residue in the fourth transmembrane domain of the A adenosine receptor is essential for ligand binding but not receptor homodimerization. *Journal of neurochemistry* 2009;110(4):1352-62.
21. Ciruela F, Casado V, Rodrigues RJ, et al. Presynaptic control of striatal glutamatergic neurotransmission by adenosine A1-A2A receptor heteromers. *J Neurosci* 2006;26(7):2080-7.
22. Nakata H, Yoshioka K, Kamiya T, Tsuga H, Oyanagi K. Functions of heteromeric association between adenosine and P2Y receptors. *J Mol Neurosci* 2005;26(2-3):233-8.
23. Fukumitsu N, Ishii K, Kimura Y, et al. Imaging of adenosine A1 receptors in the human brain by positron emission tomography with [<sup>11</sup>C]MPDX. *Annals of nuclear medicine* 2003;17(6):511-5.
24. Fernandez LG, Sharma AK, Lapar DJ, Kron IL, Laubach VE. Adenosine A1 receptor activation attenuates lung ischemia-reperfusion injury. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2013;145(6):1654-9.
25. Urmaliya VB, Pouton CW, Ledent C, Short JL, White PJ. Cooperative cardioprotection through adenosine A1 and A2A receptor agonism in ischemia-reperfused isolated mouse heart. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2010;56(4):379-88.
26. Park SW, Kim JY, Ham A, et al. A1 adenosine receptor allosteric enhancer PD-81723 protects against renal ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology* 2012;303(5):F721-32.

27. Kim M, Chen SW, Park SW, et al. Kidney-specific reconstitution of the A1 adenosine receptor in A1 adenosine receptor knockout mice reduces renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney international* 2009;75(8):809-23.
28. Park SW, Chen SW, Kim M, Brown KM, D'Agati VD, Lee HT. Protection against acute kidney injury via A(1) adenosine receptor-mediated Akt activation reduces liver injury after liver ischemia and reperfusion in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2010;333(3):736-47.
29. Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, et al. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98(16):9407-12.
30. Kochanek PM, Vagni VA, Janesko KL, et al. Adenosine A1 receptor knockout mice develop lethal status epilepticus after experimental traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26(4):565-75.
31. Sun CX, Young HW, Molina JG, Volmer JB, Schnermann J, Blackburn MR. A protective role for the A1 adenosine receptor in adenosine-dependent pulmonary injury. *The Journal of clinical investigation* 2005;115(1):35-43.
32. Torvinen M, Marcellino D, Canals M, et al. Adenosine A2A receptor and dopamine D3 receptor interactions: evidence of functional A2A/D3 heteromeric complexes. *Molecular pharmacology* 2005;67(2):400-7.
33. Canals M, Burgueno J, Marcellino D, et al. Homodimerization of adenosine A2A receptors: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *Journal of neurochemistry* 2004;88(3):726-34.
34. Vidi PA, Chemel BR, Hu CD, Watts VJ. Ligand-dependent oligomerization of dopamine D(2) and adenosine A(2A) receptors in living neuronal cells. *Molecular pharmacology* 2008;74(3):544-51.
35. Carriba P, Ortiz O, Patkar K, et al. Striatal adenosine A2A and cannabinoid CB1 receptors form functional heteromeric complexes that mediate the motor effects of cannabinoids. *Neuropsychopharmacology* 2007;32(11):2249-59.
36. Koshiba M, Rosin DL, Hayashi N, Linden J, Sitkovsky MV. Patterns of A2A extracellular adenosine receptor expression in different functional subsets of human peripheral T cells. Flow cytometry studies with anti-A2A receptor monoclonal antibodies. *Molecular pharmacology* 1999;55(3):614-24.
37. Marala RB, Mustafa SJ. Immunological characterization of adenosine A2A receptors in human and porcine cardiovascular tissues. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1998;286(2):1051-7.



38. Trevethick MA, Mantell SJ, Stuart EF, Barnard A, Wright KN, Yeadon M. Treating lung inflammation with agonists of the adenosine A2A receptor: promises, problems and potential solutions. *British journal of pharmacology* 2008;155(4):463-74.
39. Shindou T, Arbuthnott GW, Wickens JR. Actions of adenosine A 2A receptors on synaptic connections of spiny projection neurons in the neostriatal inhibitory network. *Journal of neurophysiology* 2008;99(4):1884-9.
40. Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, et al. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 1997;388(6643):674-8.
41. Day YJ, Huang L, McDuffie MJ, et al. Renal protection from ischemia mediated by A2A adenosine receptors on bone marrow-derived cells. *The Journal of clinical investigation* 2003;112(6):883-91.
42. El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM. Adenosine A2A receptor deficient mice are partially resistant to limbic seizures. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2009;380(3):223-32.
43. Kachroo A, Schwarzschild MA. Adenosine A2A receptor gene disruption protects in an alpha-synuclein model of Parkinson's disease. *Annals of neurology* 2012;71(2):278-82.
44. Pierce KD, Furlong TJ, Selbie LA, Shine J. Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain. *Biochemical and biophysical research communications* 1992;187(1):86-93.
45. Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD, Reppert SM. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 1992;6(3):384-93.
46. Dixon AK, Gubitza AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *British journal of pharmacology* 1996;118(6):1461-8.
47. Colgan SP, Fennimore B, Ehrentraut SF. Adenosine and gastrointestinal inflammation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2013;91(2):157-64.
48. Ehrentraut H, Westrich JA, Eltzschig HK, Clambey ET. Adora2b adenosine receptor engagement enhances regulatory T cell abundance during endotoxin-induced pulmonary inflammation. *PloS one* 2012;7(2):e32416.
49. Kong T, Westerman KA, Faigle M, Eltzschig HK, Colgan SP. HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia. *Faseb J* 2006;20(13):2242-50.
50. Eckle T, Grenz A, Laucher S, Eltzschig HK. A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. *The Journal of clinical investigation* 2008;118(10):3301-15.

51. Kolachala VL, Vijay-Kumar M, Dalmaso G, et al. A2B adenosine receptor gene deletion attenuates murine colitis. *Gastroenterology* 2008;135(3):861-70.
52. Liu Y, Yang X, Yang XM, et al. AMP579 is revealed to be a potent A2b-adenosine receptor agonist in human 293 cells and rabbit hearts. *Basic research in cardiology* 2010;105(1):129-37.
53. Atkinson MR, Townsend-Nicholson A, Nicholl JK, Sutherland GR, Schofield PR. Cloning, characterisation and chromosomal assignment of the human adenosine A3 receptor (ADORA3) gene. *Neuroscience research* 1997;29(1):73-9.
54. Rudich N, Ravid K, Sagi-Eisenberg R. Mast cell adenosine receptors function: a focus on the a3 adenosine receptor and inflammation. *Frontiers in immunology* 2012;3:134.
55. Rivkees SA, Thevananther S, Hao H. Are A3 adenosine receptors expressed in the brain? *Neuroreport* 2000;11(5):1025-30.
56. Choi IY, Lee JC, Ju C, et al. A3 adenosine receptor agonist reduces brain ischemic injury and inhibits inflammatory cell migration in rats. *The American journal of pathology* 2011;179(4):2042-52.
57. Chen GJ, Harvey BK, Shen H, Chou J, Victor A, Wang Y. Activation of adenosine A3 receptors reduces ischemic brain injury in rodents. *Journal of neuroscience research* 2006;84(8):1848-55.
58. Harrison GJ, Cerniway RJ, Peart J, et al. Effects of A(3) adenosine receptor activation and gene knock-out in ischemic-reperfused mouse heart. *Cardiovascular research* 2002;53(1):147-55.
59. Auchampach JA, Rizvi A, Qiu Y, et al. Selective activation of A3 adenosine receptors with N6-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide protects against myocardial stunning and infarction without hemodynamic changes in conscious rabbits. *Circulation research* 1997;80(6):800-9.
60. Wan TC, Ge ZD, Tampo A, et al. The A3 adenosine receptor agonist CP-532,903 [N6-(2,5-dichlorobenzyl)-3'-aminoadenosine-5'-N-methylcarboxamide] protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via the sarcolemmal ATP-sensitive potassium channel. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2008;324(1):234-43.
61. Young HW, Molina JG, Dimina D, et al. A3 adenosine receptor signaling contributes to airway inflammation and mucus production in adenosine deaminase-deficient mice. *J Immunol* 2004;173(2):1380-9.
62. Ochaion A, Bar-Yehuda S, Cohen S, et al. The A3 adenosine receptor agonist CF502 inhibits the PI3K, PKB/Akt and NF-kappaB signaling pathway in synoviocytes from rheumatoid arthritis patients and in adjuvant-induced arthritis rats. *Biochemical pharmacology* 2008;76(4):482-94.
63. Lee HT, Ota-Setlik A, Xu H, D'Agati VD, Jacobson MA, Emala CW. A3 adenosine receptor knockout mice are protected against ischemia- and myoglobinuria-induced renal failure. *American journal of physiology* 2003;284(2):F267-73.

64. Vincenzi F, Targa M, Corciulo C, et al. The anti-tumor effect of A3 adenosine receptors is potentiated by pulsed electromagnetic fields in cultured neural cancer cells. *PLoS one* 2012;7(6):e39317.
65. Bar-Yehuda S, Madi L, Silberman D, Gery S, Shkapenuk M, Fishman P. CF101, an agonist to the A3 adenosine receptor, enhances the chemotherapeutic effect of 5-fluorouracil in a colon carcinoma murine model. *Neoplasia (New York, NY)* 2005;7(1):85-90.
66. Madi L, Bar-Yehuda S, Barer F, Ardon E, Ochaion A, Fishman P. A3 adenosine receptor activation in melanoma cells: association between receptor fate and tumor growth inhibition. *The Journal of biological chemistry* 2003;278(43):42121-30.
67. Sata N, Hiramane K, Miyahara K, Kimura C, Tsubouchi H. Adenosine stress thallium-201 myocardial scintigraphy. *Journal of cardiology* 2007;49(1):55-7.
68. Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nature reviews* 2013;12(4):265-86.
69. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Linden J, Muller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacological reviews* 2011;63(1):1-34.
70. Balan KK, Critchley M. Is the dyspnea during adenosine cardiac stress test caused by bronchospasm? *American heart journal* 2001;142(1):142-5.
71. Role of Adenosine in the Release of VEGF and Cytokines. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), 2007. (Accessed 11-11, 2012, at
72. Prophylactic Intra-coronary Adenosine to Prevent Post Coronary Artery Stenting Myonecrosis. [www.clnicaltrials.gov](http://www.clnicaltrials.gov), 2008. (Accessed 11-11 2012, at
73. Clonidine Versus Adenosine to Treat Neuropathic Pain. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), 2006. (Accessed 11-11, 2012, at
74. Langemeijer EV, Verzijl D, Dekker SJ, Ijzerman AP. Functional selectivity of adenosine A1 receptor ligands? *Purinergic signalling* 2013;9(1):91-100.
75. Wainwright CL, Parratt JR. Effects of R-PIA, a selective A1 adenosine agonist, on haemodynamics and ischaemic arrhythmias in pigs. *Cardiovascular research* 1993;27(1):84-9.
76. Lohse MJ, Klotz KN, Schwabe U, Cristalli G, Vittori S, Grifantini M. 2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine: a highly selective agonist at A1 adenosine receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 1988;337(6):687-9.
77. Gao ZG, Jacobson KA. 2-Chloro-N(6)-cyclopentyladenosine, adenosine A(1) receptor agonist, antagonizes the adenosine A(3) receptor. *European journal of pharmacology* 2002;443(1-3):39-42.
78. Tendera M, Gaszewska-Zurek E, Parma Z, et al. The new oral adenosine A1 receptor agonist capadenoson in male patients with stable angina. *Clin Res Cardiol* 2012;101(7):585-91.

79. Ellenbogen KA, O'Neill G, Prystowsky EN, et al. Trial to evaluate the management of paroxysmal supraventricular tachycardia during an electrophysiology study with tecadenoson. *Circulation* 2005;111(24):3202-8.
80. Peterman C, Sanoski CA. Tecadenoson: a novel, selective A1 adenosine receptor agonist. *Cardiology in review* 2005;13(6):315-21.
81. Cristalli G, Lambertucci C, Marucci G, Volpini R, Dal Ben D. A2A adenosine receptor and its modulators: overview on a druggable GPCR and on structure-activity relationship analysis and binding requirements of agonists and antagonists. *Current pharmaceutical design* 2008;14(15):1525-52.
82. Rieger JM, Brown ML, Sullivan GW, Linden J, Macdonald TL. Design, synthesis, and evaluation of novel A2A adenosine receptor agonists. *Journal of medicinal chemistry* 2001;44(4):531-9.
83. Zoghbi GJ, Iskandrian AE. Selective adenosine agonists and myocardial perfusion imaging. *J Nucl Cardiol* 2006;19(1):126-41.
84. Bengalorkar GM, Bhuvana K, Sarala N, Kumar TN. Regadenoson. *Journal of postgraduate medicine* 2012;58(2):140-6.
85. Iqbal FM, Hage FG, Ahmed A, et al. Comparison of the prognostic value of normal regadenoson with normal adenosine myocardial perfusion imaging with propensity score matching. *Jacc* 2012;5(10):1014-21.
86. Johnson SG, Peters S. Advances in pharmacologic stress agents: focus on regadenoson. *Journal of nuclear medicine technology* 2010;38(3):163-71.
87. Mantell S, Jones R, Trevethick M. Design and application of locally delivered agonists of the adenosine A(2A) receptor. *Expert review of clinical pharmacology* 2010;3(1):55-72.
88. Baraldi PG, Preti D, Tabrizi MA, et al. Synthesis and biological evaluation of novel 1-deoxy-1-[6-(((hetero)arylcarbonyl)hydrazino)-9H-purin-9-yl]-N-ethyl-beta-D-ribofuranuronamide derivatives as useful templates for the development of A2B adenosine receptor agonists. *Journal of medicinal chemistry* 2007;50(2):374-80.
89. Pier Giovanni Baraldi caMAT, Francesca Fruttarolo, Romeo Romagnoli, and Delia Preti. Recent improvements in the development of A2B adenosine receptor agonists. *Purinergic Signal* 2008;4(4):287-303.
90. Koupenova M, Johnston-Cox H, Vezeridis A, et al. A2b adenosine receptor regulates hyperlipidemia and atherosclerosis. *Circulation* 2012;125(2):354-63.
91. Gao ZG, Blaustein JB, Gross AS, Melman N, Jacobson KA. N6-Substituted adenosine derivatives: selectivity, efficacy, and species differences at A3 adenosine receptors. *Biochemical pharmacology* 2003;65(10):1675-84.

92. Volpini R, Dal Ben D, Lambertucci C, et al. N6-methoxy-2-alkynyladenosine derivatives as highly potent and selective ligands at the human A3 adenosine receptor. *Journal of medicinal chemistry* 2007;50(6):1222-30.
93. Ohno M, Gao ZG, Van Rompaey P, et al. Modulation of adenosine receptor affinity and intrinsic efficacy in adenine nucleosides substituted at the 2-position. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2004;12(11):2995-3007.
94. Melman A, Gao ZG, Kumar D, et al. Design of (N)-methanocarba adenosine 5'-uronamides as species-independent A3 receptor-selective agonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2008;18(9):2813-9.
95. Yuan K, Bai GY, Park WH, Kim SZ, Kim SH. Stimulation of ANP secretion by 2-Cl-IB-MECA through A(3) receptor and CaMKII. *Peptides* 2008;29(12):2216-24.
96. Klotz KN, Falgner N, Kachler S, et al. [3H]HEMADO--a novel tritiated agonist selective for the human adenosine A3 receptor. *European journal of pharmacology* 2007;556(1-3):14-8.
97. Silverman MH, Strand V, Markovits D, et al. Clinical evidence for utilization of the A3 adenosine receptor as a target to treat rheumatoid arthritis: data from a phase II clinical trial. *The Journal of rheumatology* 2008;35(1):41-8.
98. Avni I, Garzozzi HJ, Barequet IS, et al. Treatment of dry eye syndrome with orally administered CF101: data from a phase 2 clinical trial. *Ophthalmology* 2010;117(7):1287-93.
99. Safety and Efficacy of Daily CF101 Administered Orally in Subjects With Elevated Intraocular Pressure. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), 2009. (Accessed 11-11, 2012, at
100. A Phase 1-2 Study of CF102 in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), 2008. (Accessed 11-11, 2012, at
101. Biaggioni I, Paul S, Puckett A, Arzubiaga C. Caffeine and theophylline as adenosine receptor antagonists in humans. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1991;258(2):588-93.
102. Shamim MT, Ukena D, Padgett WL, Hong O, Daly JW. 8-Aryl-and 8-cycloalkyl-1,3-dipropylxanthines: further potent and selective antagonists for A1-adenosine receptors. *Journal of medicinal chemistry* 1988;31(3):613-7.
103. Cotter G, Dittrich HC, Weatherley BD, et al. The PROTECT pilot study: a randomized, placebo-controlled, dose-finding study of the adenosine A1 receptor antagonist rolofylline in patients with acute heart failure and renal impairment. *Journal of cardiac failure* 2008;14(8):631-40.
104. Dittrich HC, Gupta DK, Hack TC, Dowling T, Callahan J, Thomson S. The effect of KW-3902, an adenosine A1 receptor antagonist, on renal function and renal plasma flow in ambulatory patients with heart failure and renal impairment. *Journal of cardiac failure* 2007;13(8):609-17.

105. Mitrovic V, Seferovic P, Dodic S, et al. Cardio-renal effects of the A1 adenosine receptor antagonist SLV320 in patients with heart failure. *Circ Heart Fail* 2009;2(6):523-31.
106. Bier D, Holschbach MH, Wutz W, Olsson RA, Coenen HH. Metabolism of the A(1)1 adenosine receptor positron emission tomography ligand [18F]8-cyclopentyl-3-(3-fluoropropyl)-1-propylxanthine ([18F]CPFPX) in rodents and humans. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2006;34(4):570-6.
107. Park A, Stacy M. Istradefylline for the treatment of Parkinson's disease. *Expert opinion on pharmacotherapy* 2012;13(1):111-4.
108. Chen W, Wang H, Wei H, Gu S, Wei H. Istradefylline, an adenosine A(2A) receptor antagonist, for patients with Parkinson's Disease: A meta-analysis. *Journal of the neurological sciences* 2012.
109. Gessi S, Varani K, Merighi S, et al. Novel selective antagonist radioligands for the pharmacological study of A(2B) adenosine receptors. *Purinergic signalling* 2006;2(4):583-8.
110. Zablocki J, Kalla R, Perry T, et al. The discovery of a selective, high affinity A(2B) adenosine receptor antagonist for the potential treatment of asthma. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2005;15(3):609-12.
111. Kalla RV, Zablocki J, Tabrizi MA, Baraldi PG. Recent developments in A2B adenosine receptor ligands. *Handbook of experimental pharmacology* 2009(193):99-122.
112. Li AH, Moro S, Melman N, Ji XD, Jacobson KA. Structure-activity relationships and molecular modeling of 3, 5-diacyl-2,4-dialkylpyridine derivatives as selective A3 adenosine receptor antagonists. *Journal of medicinal chemistry* 1998;41(17):3186-201.
113. Okamura T, Kurogi Y, Hashimoto K, et al. Structure-activity relationships of adenosine A3 receptor ligands: new potential therapy for the treatment of glaucoma. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2004;14(14):3775-9.
114. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2002;34(12):1508-12.
115. Schmidt EP, Yang Y, Janssen WJ, et al. The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis. *Nature medicine* 2012.
116. King J, Hamil T, Creighton J, et al. Structural and functional characteristics of lung macro- and microvascular endothelial cell phenotypes. *Microvascular research* 2004;67(2):139-51.
117. Comhair SA, Xu W, Mavrakis L, Aldred MA, Asosingh K, Erzurum SC. Human primary lung endothelial cells in culture. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2012;46(6):723-30.
118. Ochoa CD, Wu S, Stevens T. New developments in lung endothelial heterogeneity: Von Willebrand factor, P-selectin, and the Weibel-Palade body. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2010;36(3):301-8.

119. Kelly JJ, Moore TM, Babal P, Diwan AH, Stevens T, Thompson WJ. Pulmonary microvascular and macrovascular endothelial cells: differential regulation of Ca<sup>2+</sup> and permeability. *The American journal of physiology* 1998;274(5 Pt 1):L810-9.
120. Chetham PM, Babal P, Bridges JP, Moore TM, Stevens T. Segmental regulation of pulmonary vascular permeability by store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *The American journal of physiology* 1999;276(1 Pt 1):L41-50.
121. Stevens T. Functional and molecular heterogeneity of pulmonary endothelial cells. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2011;8(6):453-7.
122. Lowe K, Alvarez D, King J, Stevens T. Phenotypic heterogeneity in lung capillary and extra-alveolar endothelial cells. Increased extra-alveolar endothelial permeability is sufficient to decrease compliance. *The Journal of surgical research* 2007;143(1):70-7.
123. Ofori-Acquah SF, King J, Voelkel N, Schaphorst KL, Stevens T. Heterogeneity of barrier function in the lung reflects diversity in endothelial cell junctions. *Microvascular research* 2008;75(3):391-402.
124. Solodushko V, Fouty B. Proliferative phenotype of pulmonary microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292(3):L671-7.
125. Nicolls MR, Voelkel NF. Hypoxia and the lung: beyond hypoxic vasoconstriction. *Antioxidants & redox signaling* 2007;9(6):741-3.
126. Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circulation research* 1995;77(3):638-43.
127. Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, et al. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *Faseb J* 2001;15(2):427-38.
128. Tsai BM, Wang M, Pitcher JM, Meldrum KK, Meldrum DR. Hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary artery tissue cytokine expression are mediated by protein kinase C. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287(6):L1215-9.
129. Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Wang L, et al. Erythropoietin and hypoxia increase erythropoietin receptor and nitric oxide levels in lung microvascular endothelial cells. *Cytokine* 2011;54(2):129-35.
130. Fike CD, Sidoryk-Wegrzynowicz M, Aschner M, et al. Prolonged hypoxia augments L-citrulline transport by System A in the newborn piglet pulmonary circulation. *Cardiovascular research* 2012;95(3):375-84.
131. Tamaru N, Watanabe K, Yoshida M, Reitz-Vick DM, Townsend L, Glover J. Angiotensin-converting enzyme activity by canine pulmonary microvascular and central pulmonary artery endothelial cells exposed to hypoxia. *Lung* 2000;178(4):249-55.

132. Solodushko V, Parker JC, Fouty B. Pulmonary microvascular endothelial cells form a tighter monolayer when grown in chronic hypoxia. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2008;38(4):491-7.
133. Van Linden A, Eltzschig HK. Role of pulmonary adenosine during hypoxia: extracellular generation, signaling and metabolism by surface adenosine deaminase/CD26. *Expert opinion on biological therapy* 2007;7(9):1437-47.
134. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'---3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991;88(16):7276-80.
135. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome research* 1996;6(10):986-94.
136. Cechova S, Elsobky AM, Venton BJ. A1 receptors self-regulate adenosine release in the striatum: evidence of autoreceptor characteristics. *Neuroscience* 2010;171(4):1006-15.
137. Umapathy NS, Fan Z, Zemskov EA, Alieva IB, Black SM, Verin AD. Molecular mechanisms involved in adenosine-induced endothelial cell barrier enhancement. *Vascular pharmacology* 2010;52(5-6):199-206.
138. Wagner R, Ngamsri KC, Stark S, Vollmer I, Reutershan J. Adenosine receptor A3 is a critical mediator in LPS-induced pulmonary inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010;299(4):L502-12.
139. Hammond LC, Bonnet C, Kemp PJ, Yates MS, Bowmer CJ. Chronic hypoxia up-regulates expression of adenosine A1 receptors in DDT1-MF2 cells. *Biochemical pharmacology* 2004;67(3):421-6.
140. Desai A, Victor-Vega C, Gadangi S, Montesinos MC, Chu CC, Cronstein BN. Adenosine A2A receptor stimulation increases angiogenesis by down-regulating production of the antiangiogenic matrix protein thrombospondin 1. *Molecular pharmacology* 2005;67(5):1406-13.
141. Ahmad A, Ahmad S, Glover L, et al. Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2alpha in pulmonary endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106(26):10684-9.
142. Kobayashi S, Millhorn DE. Stimulation of expression for the adenosine A2A receptor gene by hypoxia in PC12 cells. A potential role in cell protection. *The Journal of biological chemistry* 1999;274(29):20358-65.
143. Shimoda LA, Laurie SS. Vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2013;91(3):297-309.



144. Zhao L. Chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat: the best animal model for studying pulmonary vasoconstriction and vascular medial hypertrophy. *Drug Discovery Today: Disease Models* 2010; 7(3-4):83-8.
145. Gazoni LM, Walters DM, Unger EB, Linden J, Kron IL, Laubach VE. Activation of A1, A2A, or A3 adenosine receptors attenuates lung ischemia-reperfusion injury. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2010;140(2):440-6.
146. Tan JX, Huang XL, Wang B, Fang X, Huang DN. [Adenosine receptors agonists mitigated PAH of rats induced by chronic hypoxia through reduction of renin activity/angiotensin II levels and increase of inducible nitric oxide synthase-nitric oxide levels]. *Zhonghua er ke za zhi* 2012;50(10):782-7.
147. Stella L, de Novellis V, Marabese I, et al. The role of A3 adenosine receptors in central regulation of arterial blood pressure. *British journal of pharmacology* 1998;125(3):437-40.
148. Jonigk D, Golpon H, Bockmeyer CL, et al. Plexiform lesions in pulmonary arterial hypertension composition, architecture, and microenvironment. *The American journal of pathology* 2011;179(1):167-79.
149. Rai PR, Cool CD, King JA, et al. The cancer paradigm of severe pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2008;178(6):558-64.
150. Fishman P, Bar-Yehuda S, Madi L, Cohn I. A3 adenosine receptor as a target for cancer therapy. *Anti-cancer drugs* 2002;13(5):437-43.