

Rola ektopuryn w procesie od zapalenia do demielinizacji – perspektywy powstania nowych metod leczenia stwardnienia rozsianego

The role of ecto-purines in inflammation leading to demyelination – new means for therapies against multiple sclerosis

Marek Cieślak¹, Michał Komoszyński²

¹Oddział Neurologiczny, Wojewódzki Szpital Zespolony w Toruniu

²Zakład Biochemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Neurologia i Neurochirurgia Polska 2011; 45, 5: 489–499

Streszczenie

Autorzy przedstawili rolę sygnalizacji purynergiczej w indukcji procesów zapalnych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) prowadzących do powstania stwardnienia rozsianego. Biorą w nich udział nukleotydy uwalniane z aktywowanych bądź uszkodzonych komórek. Pozakomórkowe nukleotydy rozpoznawane są w OUN jako ostrzegawcze sygnały i poprzez aktywację receptorów P2 (jonotropowe P2X i metabotropowe P2Y) aktywują procesy zapalne. Receptory P2 są obecne na komórkach OUN (komórki astrogleju i mikrogleju) oraz na komórkach układu immunologicznego, tj. limfocytach T i B, migrujących do OUN. Aktywacja obecnych na tych komórkach receptorów P2 aktywuje egzocytozę prozapalnych cytokin i chemokin oraz migrację i proliferację komórek immunologicznych, co prowadzi do demielinizacji i uszkodzenia aksonów. Aktywacja receptorów P2 jest kontrolowana przez enzymy – ektonukleotydazy, hydrolizujące pozakomórkowe nukleotydy, które są obecne na astrocytach, oligodendrocytach, komórkach mikrogleju oraz komórkach śródbłonna i limfocytach T. Hydroliza pozakomórkowego ATP i ADP przez NTPD-azy i ekto-5'-nukleotydazę powoduje powstanie ektoadenozyny, która poprzez pobudzenie receptorów P1 indukuje procesy hamujące zapalenie i immunosupresję.

Słowa kluczowe: procesy zapalne, demielinizacja, immunosupresja, ektopuryny, ektopirimidyny.

Abstract

Nucleotides released from activated and/or injured cells activate P2 receptors. Extracellular nucleotides serve as danger signals or damage-associated molecular patterns (DAMPs) that trigger various immune responses. Indeed, P2 receptors are highly expressed in the astrocytes, microglia and other immune cells such as T and B lymphocytes that migrate to the central nervous system. The activation of P2 receptors triggers the secretion of proinflammatory cytokines and chemokines as well as immune cell migration and proliferation that contribute to demyelination and axonal damage. The activation of P2 receptors is controlled by the ectonucleotidases which hydrolyze extracellular nucleotides. Ecto-NTPDases and ecto-5'-nucleotidase are expressed in the astrocytes, oligodendrocytes, microglia, endothelial cells and activated T cells. The hydrolysis of extracellular ATP and ADP by enzymes results in the generation of extracellular adenosine. This nucleoside interacts with P1 receptors and activates anti-inflammatory and immunosuppressive responses in the cells involved in MS.

Key words: inflammation, demyelination, immunosuppression, ecto-purines, ecto-pyrimidines.

Adres do korespondencji: dr med. Marek Cieślak, Wojewódzki Szpital Zespolony, Oddział Neurologiczny, ul. św. Józefa 53/59, 87-100 Toruń, e-mail: marcies@autograf.pl

Pracę otrzymano: 5.02.2011; przyjęto do druku: 7.07.2011

Wstęp

Dotychczasowa wiedza o etiologii stwardnienia rozsianego (SR) pozwala na stwierdzenie, że jest ono chorobą autoimmunologiczną, w której rozwija się wieloogniskowy proces zapalny prowadzący do demielinizacji, wtórnego przerostu astrogleju i uszkodzenia aksonów, a etapem końcowym jest glejzoza (bliznowacenie) [1]. Sądzi się, że uszkodzenie aksonów prowadzi do ich zwyrodnienia typu Wallera, a następnie do zaniku dendrytów i ciał komórek nerwowych, co jest przyczyną ogniskowego deficytu neurologicznego [2].

Na powstanie SR wpływają różne czynniki: środowiskowe, genetyczne i immunologiczne. Do czynników środowiskowych zalicza się zakażenia wirusowe, wywoływane zwłaszcza przez wirusy opryszczki typu 6 (*human herpesvirus 6* – HHV-6) oraz retrowirusy związane z SR (*multiple sclerosis associated retrovirus* – MSRV). Dotychczas nie udało się jednak wyizolować żadnego wirusa jako czynnika etiologicznego SR. Obserwowany we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym wzrost miana przeciwciał skierowanych przeciw różnym wirusom jest niepewnym dowodem, ponieważ może być następstwem nieswoistej poliklonalnej aktywacji limfocytów przez cytokiny.

Istnieje również uwarunkowana genetycznie predyspozycja do nieprawidłowej reaktywności immunologicznej. Allele genów znajdujących się na chromosomie 6, kodujących antygeny HLA (*human leukocyte antigen*), zwiększają prawdopodobieństwo zachorowania na SR. Około 50–60% chorych na SR ma haplotyp DRB1*1501 będący podtypem genu *DR15*. Dodatkowych dowodów na tło genetyczne SR dostarczają nam badania rodzinnego występowania choroby.

W patofizjologii SR uczestniczą zarówno komórki rezydentne mózgu i rdzenia, jak i komórki układu immunologicznego, takie jak limfocyty T i B migrujące do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). W OUN komórki mikrogleju jako rezydentne komórki immunologiczne są zdolne do reagowania na patogeny lub uszkodzenie komórek. Odbywa się to z udziałem migracji tych komórek do miejsca zapalenia lub uszkodzenia. Skutkiem jest dostarczenie przez mikroglej odpowiedzi immunologicznej, takiej jak fagocytoza mikroorganizmów lub pozostałości komórkowych, oraz wydzielanie cytokin, chemokin i innych mediatorów zapalenia do różnych struktur i obszarów OUN [3–5]. W procesach zapalnych powstających w OUN uczestniczą również astrocyty. Przetrwałą astroglejozę stwierdzono m.in. w SR i udarze niedokrwiennym mózgu [3,4]. W procesach za-

palnych w układzie nerwowym stwierdzono również astroglejozę reaktywną. Powyższy proces powoduje aktywację proliferacji komórek, hipertrofię komórkową, wzmożone tworzenie neutrofilów i mediatorów zapalenia [3,4].

W SR istotną rolę odgrywają autoreaktywne limfocyty T i B, które w zapaleniu migrują do OUN. W miejscu zapalenia komórki mikrogleju ponownie aktywują te limfocyty T, które wniknęły do OUN. Aktywne limfocyty T mogą niszczyć komórki mózgu i rdzenia bezpośrednio oraz z udziałem wydzielanych cytokin prozapalnych, takich jak interleukiny – IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, a także czynnika martwicy nowotworu α (*tumor necrosis factor* α – TNF- α) i interferonu γ (IFN- γ). Dodatkowo uwalniane chemokiny stymulują ekspresję cząsteczek adhezyjnych obecnych na komórkach śródbłonna. Chemokiny, łącząc się z odpowiednimi białkami adhezyjnymi (VLA-4 dla VCAM-1 oraz LFA-1 dla ICAM-1), ułatwiają przenikanie kolejnych autoreaktywnych limfocytów T z krwi do mózgu i rdzenia. W procesie migracji limfocytów do OUN uczestniczą metaloproteinazy.

Aktywacja limfocytów B stymuluje syntezę przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom mieliny i oligodendrocytów. Dowód na to stanowi obecność w płynie mózgowo-rdzeniowym u 95% pacjentów z SR prążków oligoklonalnych. Jest to dowód na wewnątrzkanałową nadmierną produkcję immunoglobulin klasy IgG. Należy podkreślić, że powyższy proces jest nieswoisty dla SR i występuje również w innych schorzeniach OUN.

Z przytoczonych faktów wynika, że procesy zapalne występują na wszystkich etapach SR. W ostatnich latach udowodniono, że istotnym czynnikiem indukującym procesy zapalne są ektonukleotydy. Związki te pojawiają się w przestrzeni pozakomórkowej w wyniku uszkodzenia komórek, egzocytozy i procesów metabolicznych zachodzących w przestrzeni pozakomórkowej z udziałem ekto-NTPD-az i ektokinaz nukleotydów [6]. Jednocześnie adenosynotrifosforan (*adenosine-5'-triphosphate* – ATP), adenosynodifosforan (*adenosine diphosphate* – ADP), urydino-5'-trifosforan (*uridine-5'-triphosphate* – UTP) i urydino-5'-difosforan (*uridine 5'-diphosphate* – UDP) są związkami należącymi do grupy cząsteczek ostrzegawczych [7].

Ścisły związek SR z procesami zapalnymi oraz udział w aktywacji tych procesów ektonukleotydów jest powodem przygotowania niniejszej pracy przeglądowej. Nukleotydy są również uwalniane przez komórki OUN aktywowane podczas procesów zapalnych [8,9]. Pozakomórkowe nukleotydy inicjują różnorodne odpowiedzi

immunologiczne poprzez aktywację swoistych receptorów membranowych P2, które obejmują jonowe receptory P2X (P2X₁₋₇) i zależne od białek G receptory P2Y (P2Y_{1,2,4,6,11-14}) [10,11].

Adenozynotrifosforan aktywuje wszystkie receptory P2X i P2Y; receptory P2Y₁, P2Y₁₂ i P2Y₁₃ są aktywowane przez ADP, P2Y₄ przez UTP, P2Y₆ przez UDP, a P2Y₁₄ przez UDP-glukozę [8,10]. NTPD-azy hydrolizują nukleotydy tri- i difosforanowe, a ekto-5'-nukleotydaza hydrolizuje AMP [6]. Zarówno receptory P2X i P2Y, jak i NTPD-azy i 5'-nukleotydaza (CD73) znajdują się na wszystkich komórkach OUN, w tym neuronach, oligodendrocytach, obu typach komórek glijowych i uczestniczą w procesach zapalnych (mikroglej i astrocycy). Stwierdzono, że komórki mikrogleju zawierają receptory P2X₄ i P2X₇ oraz P2Y₆ i P2Y₁₂ [3,4]. Limfocyty T i B migrujące do OUN zawierają również liczne receptory P2, takie jak P2X₄, P2X₁, P2X₇, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂ i P2Y₁₃ [12,13].

Istotną rolę w procesach zapalnych odgrywa również druga podklasa receptorów purynowych (P1), nazywanych receptorami adenozynowymi, które w przeciwieństwie do receptorów P2 – nukleotydowych – aktywują procesy przeciwzapalne. Obie te grupy receptorów powiązane są przez ektoenzymy (nukleotydazy), które degradując nukleotydy, produkują adenozynę, będącą agonistą receptorów adenozynowych P1 [6]. Adenozyna spełnia swoje funkcje poprzez aktywację swoistych receptorów znajdujących się na powierzchni komórek, tzw. receptorów P1 (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃). W OUN receptory adenozynowe znajdują się na komórkach nerwowych oraz komórkach glicy (astrocytach i mikrogleju); na komórkach mikrogleju nie ma receptorów A_{2B} [11].

Do dziś nie ma wczesnych i wiarygodnych markerów biologicznych rozpoznania i przebiegu SR. Intencją autorów jest zatem omówienie udziału sygnalizacji purynergiczej w etiologii SR. Wiedza o udziale nukleotydów i adenozyny w procesach zapalnych i demielinizacji może mieć potencjalne zastosowanie w diagnostyce SR, zwłaszcza w sytuacji, gdy obraz rezonansu magnetycznego (RM) jest niejednoznaczny i wymaga różnicowania z ogniskami naczyniopochodnymi. Szczególny problem diagnostyczny istnieje u pacjentów z odosobnionym zespołem klinicznym, u których w 30–70% przypadków w późniejszym czasie rozwija się klinicznie pewne SR. Innym zastosowaniem znajomości sygnalizacji purynergiczej może być przewidywanie przebiegu choroby, zwłaszcza konwersji postaci nawracająco-zwalniającej w postać wtórnie postępującą. Innym potencjalnym zastosowaniem znajomości sygnalizacji puryn-

nergicznej może być wybór odpowiedniego leczenia immunomodulacyjnego dla chorych na SR.

Puryny cząsteczkami informującymi o zmianach metabolizmu prowadzącymi do śmierci komórek – sygnały niebezpieczeństwa, ostrzegawcze (*danger signals*)

Aktywacja układu immunologicznego odbywa się z udziałem cząsteczek stanowiących sygnały ostrzegawcze (*danger signals*) [7,14,15]. Pierwotny sygnał ostrzegawczy powoduje syntezę aktywnych komórek odpornościowych i wskazuje na obecność patogenów, uszkodzenia komórek lub mutacji, które mogą doprowadzić do ich śmierci. Sygnał ten zapoczątkowuje dychotomiczną odpowiedź immunologiczną, która przejawia się z jednej strony niszczeniem patogenów przez cytokiny, reaktywne formy tlenowe i azotowe oraz cytotoxyczność komórkową, a z drugiej – rozprzestrzenieniem procesów zapalnych dzięki uwalnianiu cytokin prozapalnych i chemokina. Niekontrolowana ekspansja procesów zapalnych może powodować uszkodzenie tkanek i utratę ich funkcji. Sąsiednie tkanki, aby uchronić się przed uszkodzeniem, stają się źródłem wtórnego sygnału aktywującego wtórną reakcję przeciwzapalną. Ten wtórny sygnał ostrzegawczy wskazuje na zagrożenie ze strony nadreaktywnych komórek immunologicznych i powoduje zmniejszenie aktywności prozapalnej. Sądzi się, że efekt końcowy stanowi względna równowaga między pierwotnym sygnałem prozapalnym i wtórnym sygnałem antyzapalnym.

Prozapalne funkcje pozakomórkowych nukleotydów

Od niedawna wiadomo, że ATP znajdujący się poza komórką, aktywując receptory P2, stymuluje proliferację komórek mikrogleju i limfocytów oraz wydzielanie cytokin i procesy zapalne [3,4,8,16,17]. Powyższe funkcje puryn zidentyfikowano dzięki badaniom prowadzonym w ostatnich 10 latach [18–21]. W ciągu ostatnich kilku lat wszystkie receptory P2 uczestniczące w procesach zapalnych zostały sklonowane. Ich obecność stwierdzono na powierzchni komórek uczestniczących w procesach zapalnych [3,4]. W procesie zapalnym stężenie ATP w przestrzeni pozakomórkowej znacząco się zwiększa i aktywuje receptor P2X₇. Zaktywowany receptor uczestniczy w dojrzewaniu i wydzielaniu kluczowej

cytokiny prozapalnej – IL-1 β [3,4,22]. Obecnie wiadomo, że również ADP i adenylo-5'-monofosforan (*adenosine monophosphate* – AMP) uwalniają IL-1 β z komórek mikrogleju przez aktywację receptorów P2X₇ [5,23]. Udział AMP jako cząsteczki sygnałowej w tym procesie jest kontrowersyjny i wymaga dalszych badań. ATP i ADP, aktywując receptor P2Y₁₂, pobudzają mikroglej do chemotaksji, podczas gdy UDP, aktywując receptor P2Y₆, ułatwia fagocytozę pozostałości uszkodzonych komórek. Okazuje się również, że ATP jest nieodzowny dla wydzielania przez komórki odpornościowe Th1 cytokin i IFN- γ . Ten ostatni związek aktywuje wydzielanie przez limfocyty i makrofagi kolejnych cząsteczek uczestniczących w procesach zapalnych [24].

Sądzi się, że najważniejszą rolę w procesach zapalnych odgrywa receptor P2X₇, dawniej znany jako receptor P2XZ – „receptor śmierci komórek” [5]. Jest on niezwykłym receptorem w rodzinie P2, gdyż – w odróżnieniu od innych receptorów – wymaga do aktywacji zarówno mikromolowych, jak i milimolowych stężeń ATP [25]. W warunkach fizjologicznych wewnątrzkomórkowe stężenie ATP jest bardzo duże (5–10 mM), natomiast w przestrzeni pozakomórkowej małe (nM) [3–5]. W OUN P2X₇ występuje na komórkach mikrogleju, komórkach Schwanna i astrocytach. Poza OUN receptor P2X₇ jest obecny na limfocytach, erytrocytach, monocytach i tkankowych makrofagach [12,25,26]. U chorych na SR stwierdzono znaczny wzrost immunoreaktywności nie tylko w komórkach mikrogleju mózgu, lecz także rdzenia kręgowego [27]. Stymulacja tego receptora aktywuje wydzielanie neuroprzekazników pobudzających z astrocytów [25,28]. Aktywacja receptora P2X₇ monocytów/makrofagów, komórek śródbłonka powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia potasu, co z kolei prowadzi do aktywacji kaspazy 1, oraz powoduje uwalnianie do przestrzeni pozakomórkowej cytokin prozapalnych, w tym dojrzałej formy IL-1 β i TNF- α , co skutkuje wewnątrzkomórkową mobilizacją jonów Ca²⁺ [12,25,29,30]. Wzrastające stężenie IL-1 β powoduje aktywację syntetazy tlenku azotu, cyklooksygenazy 2 i TNF- α [25,31]. Aktywacja receptora P2X₇ warunkuje także uruchomienie szeregu mechanizmów, w które zaangażowane są takie enzymy, jak fosfolipaza D (PLD), fosfolipaza A2 (PLA2), czynnik jądrowy κ B (*nuclear factor κ* – NF- κ B), oraz kinazy białkowe aktywowane przez miogen (*miogen-activated protein kinases* – MAPKs) [25,26].

Wytworzone i wydzielone poprzez aktywację P2X₇ cytokiny powodują dalszy rozwój stanów zapalnych.

cytokina prozapalna IL-1 β uczestniczy w aktywacji syntezy IL-2 oraz indukuje ekspresję jej receptora. Ponadto pobudza wytwarzanie przez limfocyty, makrofagi i komórki śródbłonka IFN- γ i IL-6 oraz zwiększa adhezję limfocytów T do komórek śródbłonka. Skutkiem jest zwiększona ekspresja takich cząsteczek, jak selektyna E, ICAM-1 i VCAM-1. Białka adhezyjne znajdujące się na powierzchni komórek śródbłonka, np. VCAM-1, odgrywają ważną rolę w przenikaniu do OUN autoreaktywnych limfocytów T, gdyż wiąże się z nimi znajdująca się na powierzchni limfocytów α 4 β 1 integryna (VLA-4). Natalizumab stosowany u chorych na SR uniemożliwia połączenie α 4 β 1 integryny z białkiem VCAM-1, a tym samym blokuje przenikanie do OUN autoreaktywnych limfocytów T [32–34]. W aktywacji procesów zapalnych uczestniczą również inne receptory purynowe, tj. P2Y₂, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂ [3,4,12,13,35–39]. Receptor P2Y₁₁ – o dużej swoistości względem ATP – bierze udział w regulacji odporności wrodzonej i nabytej oraz w modyfikacji działania komórek dendrytycznych [35–37]. Aktywacja tego receptora powoduje zwiększenie wydzielania IL-23 oraz hamuje produkcję przez komórki dendrytyczne IL-12 i IL-27. Zatem hamowanie wydzielania IL-12 i IL-27 przez ATP lub PGE₂ w warunkach fizjologicznych może prowadzić do powstania negatywnych mechanizmów polegających na ograniczeniu aktywacji limfocytów T [35]. Tak więc hamujący wpływ ATP na powyższe procesy mógłby być korzystny w niektórych stanach patologicznych, również w SR związanym z aktywacją limfocytów T i przenikaniem ich do OUN.

Interleukina 23 jest wytwarzana przez komórki dendrytyczne i aktywuje proliferację i cytotoksyczność limfocytów T. Jest niezbędna do powstawania limfocytów T pamięci i procesu autoimmunizacji, dzięki temu limfocyty T pamięci są w stanie wydzielać IL-17. Dlatego IL-23 odgrywa ważną rolę w chorobach autoimmunologicznych, np. w autoimmunologicznym zapaleniu mózgu. Mimo iż zdolność komórek dendrytycznych do wydzielania cytokin *in vitro* jest dobrze udokumentowana, do dzisiaj nie ma dostatecznych dowodów na istnienie takiego procesu *in vivo*. Interesującym spostrzeżeniem jest doniesienie Marteau i wsp., którzy wykazali, że również ADP, aktywując receptor P2Y₁₁, hamuje wydzielanie z komórek dendrytycznych IL-12p70 i IL-12p40 oraz TNF- α [37]. Zatem ATP wpływa na czynność komórek dendrytycznych nie tylko bezpośrednio przez wzrost cAMP i aktywację receptora P2Y₁₁, lecz także pośrednio, będąc źródłem pozakomórkowego ADP, który aktywuje receptory zależne od białka G₁ [38].

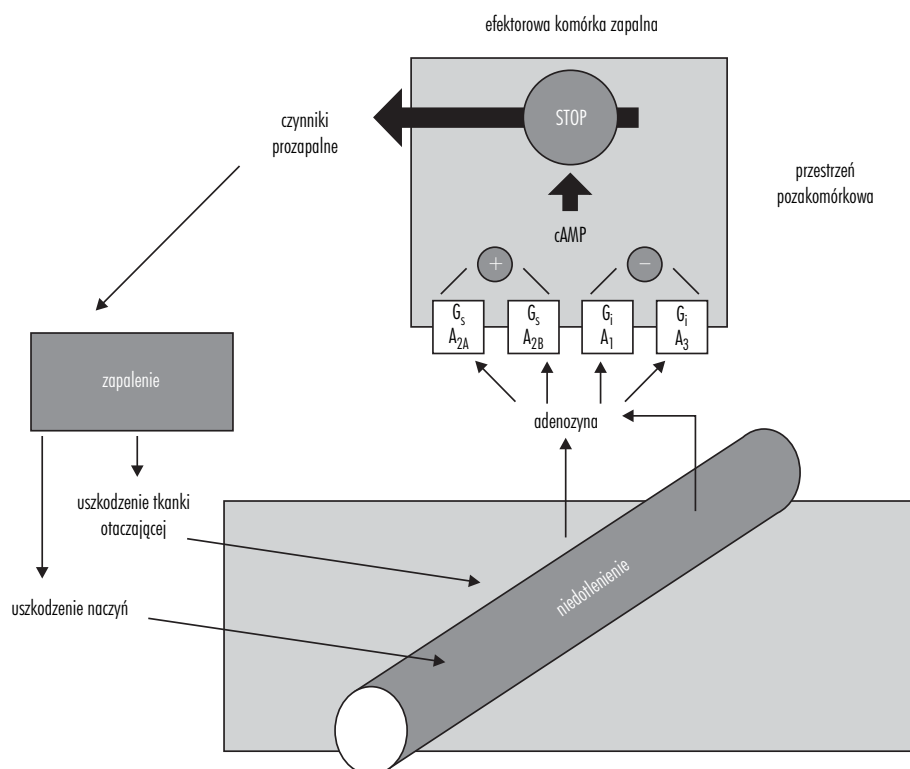
Przeciwpalne funkcje pozakomórkowej adenozyiny

Głównym źródłem adenozyiny w przestrzeni pozakomórkowej jest hydroliza ektonukleotydów adeninowych przez ektonukleotydazy. W OUN adenozyina wpływa na wiele procesów fizjologicznych, takich jak neuroprotekcja oraz hamowanie procesów zapalnych [39]. Adenozyina zmniejsza proliferację limfocytów T oraz wydzielanie cytokin przez te komórki i komórki mikrogleju [40,41]. Ochrona i naprawa tkanek przez adenozyinę odbywa się poprzez aktywację czterech mechanizmów: wzrost wskaźnika podaży/popytu tlenu, działanie przeciwpalne, stymulację angiogenezy oraz utrzymywanie stanu gotowości immunologicznej [11]. Aktywacja receptorów adenozyinowych obecnych na komórkach immunologicznych hamuje syntezę TNF- α i metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zwiększa ekspresję cytokin neuroprotektynnych i przeciwpalnych, takich jak IL-6 i IL-10 [42].

Sitkovsky i Otha uważają, że najistotniejszą zmianą powstałą w wyniku odpowiedzi immunologicznej jest za-

burzenie mikrokrążenia i powstanie lokalnego niedotlenienia tkanek. Hipoksja stanowi bodziec do znacznego zwiększenia stężenia adenozyiny w przestrzeni pozakomórkowej w wyniku szybkiej degradacji ATP, uwalnianego w znacznych ilościach z obumierających komórek, a ponadto z zakończeń nerwowych wraz z neuroprzebieżnikami pobudzającymi. Niedotlenienie powoduje również wzrost produkcji wewnątrzkomórkowej adenozyiny i jej wzmożony transport do przestrzeni pozakomórkowej przez transportery białkowe i stopniową aktywację wszystkich receptorów adenozyinowych. Ponadto hipoksja powoduje w OUN wzrost aktywności ektoenzymów i hamowanie aktywności kinazy adenozyiny, która w warunkach fizjologicznych powoduje fosforylację adenozyiny do AMP [11]. W stanach niedotlenienia i zapalenia stężenie pozakomórkowej adenozyiny wzrasta z nanomolarnego do wartości bliskiej 10–50 μM (ryc. 1.) [43].

W OUN receptor adenozyinowy A_1 występuje obficie na neuronach, komórkach mikrogleju, a także makrofagach [44–46]. Aktywacja receptora A_1 wpływa na procesy neurozapalne i towarzyszącą im demielinizację zarówno w SM, jak i modelu eksperymentalnego, aler-



Ryc. 1. Rola adenozyiny i receptorów adenozyinowych w procesach zapalnych (zmodyfikowano na podstawie [41])

Fig. 1. The role of adenosine and P1 receptors in inflammation (according to [41])

gicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego [42]. Aktywacja receptorów A_1 i A_3 sprzężonych z białkami G_1 hamuje cyklazę adenylanową i daje efekt odwrotny do aktywacji receptorów A_2 . Tak więc aktywacja receptorów A_1 i A_3 stymuluje wydzielanie przez komórki immunologiczne czynników prozapalnych.

Komórki gleju w zależności od stopnia uszkodzenia komórek OUN są zdolne do syntezy cytokin prozapalnych i antyzapalnych. Komórki mikrogleju i makrofagi pacjentów z SR charakteryzują się obniżoną ekspresją i aktywnością receptora A_1 [47]. Aktywacja receptorów A_1 stymuluje uwalnianie z astrocytów neuronalnego czynnika wzrostu (*nerve growth factor* – NGF), podczas gdy aktywacja receptorów A_{2B} i A_3 powoduje egzocytozę IL-6 i cytokiny CCL2 [45,46,48]. Receptor A_{2A} zmniejsza aktywność syntazy tlenu azotu (NOS) wydzielanej w następstwie stymulacji takich czynników prozapalnych, jak lipopolisacharyd (LPS), IFN- γ oraz TNF- α i IL-1 β [11].

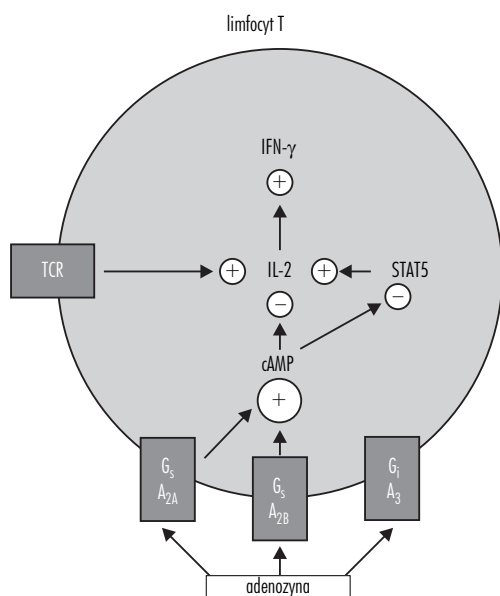
Aktywacja receptorów A_{2A} i A_{2B} powoduje w komórkach zwiększenie stężenia cAMP, co ma istotne znaczenie dla hamowania wydzielania czynników prozapalnych przez komórki immunologiczne. Receptory A_1 i A_{2A} charakteryzują się dużym, a receptory A_{2B} i A_3 małym powinowactwem do adenozyne. Odmierna wrażliwość receptorów A_{2A} i A_{2B} na adenozyne sugeruje,

że wraz z rosnącym niedotlenieniem tkanek adenozyne ulega stopniowej kumulacji w miejscu zapalenia. Aktywacja receptorów A_2 hamuje wytwarzanie TNF- α , wydzielanie IL-12 i chemokiny CXCL10 oraz powoduje zwiększenie wydzielania IL-10 i uwalniania chemokiny CCL17 [11].

W SR hamowanie wydzielania IL-12 może być korzystne, gdyż IL-12 stymuluje jednocześnie proliferację, aktywację i cytotoksyczność limfocytów T i komórek NK (*natural killers cells*) oraz wytwarzanie przez te komórki IFN- γ i TNF. Jednocześnie IL-12 aktywuje wydzielanie IL-10, która z kolei hamuje wytwarzanie IFN- γ i IL-2. Dlatego aktywacja obu receptorów A_2 jest silnym czynnikiem immunosupresyjnym. Powyższe obserwacje zostały potwierdzone w badaniach przeprowadzonych na zwierzętach [15].

Zróznicowany wpływ adenozyne na wydzielanie czynników prozapalnych z udziałem receptorów A_{2A} , A_{2B} bądź A_1 i A_3 zapobiega nieuzasadnionej stanem fizjologicznym stymulacji lub inhibicji aktywności komórek immunologicznych, a tym samym aktywacji lub hamowaniu wydzielania cytokin prozapalnych.

W odpowiedzi na czynniki ostrzegawcze (ATP) zwiększa się proliferacja astrocytów i mikrogleju, jednak aktywacja receptorów A_1 oraz A_{2A} może zwiększać lub zmniejszać proliferację astrocytów [44].



IFN- γ – interferon γ , TCR (T cell receptor) – receptor limfocytów T, IL-2 – interleukina 2, STAT5 (signal transducers and activator of transcription) – białko STAT5, cAMP (cyclic adenosine monophosphate) – cykliczny adenozynomonofosforan

Ryc. 2. Rola receptorów adenozynowych w regulacji czynności limfocytów T uczestniczących w odporności komórkowej (zmodyfikowano na podstawie [49])

Fig. 2. The role of P1 receptors in the regulation of T lymphocyte functions in immune responses (according to [49])

Wpływ adenozyne na funkcje limfocytów T

Autoreaktywne limfocyty T migrujące do OUN charakteryzują się wysoką aktywnością deaminazy adenozyne (*adenosine deaminase activity* – ADA) i obecnością receptorów adenozynowych A_{2A} , A_{2B} , i A_3 oraz brakiem receptorów A_1 [49–51]. Aktywacja limfocytów T jest wynikiem rozpoznania antygeny z udziałem receptorów specyficznego antygeny i cząsteczek CD4 lub CD8, co uruchamia kaskadę sygnalizacji prowadzącej do wydzielania cytokin, zwiększenia cytotoksyczności komórkowej i proliferacji komórek T [49].

Działanie immunosupresyjne adenozyne na cytotoksyczne limfocyty T (CTL) może być wynikiem aktywacji receptorów A_{2A} i A_{2B} . Skutki ich działania są antagonistyczne względem receptora limfocytów T wiążącego antygen (*T cell receptor* – TCR). Aktywacja receptorów A_{2A} i A_{2B} powoduje wzrost stężenia cAMP w komórkach T, co z kolei hamuje w nich syntezę IL-2. Wzrost wytwarzania IL-2 w limfocytach T odbywa się z udziałem TCR i białka STAT5 (*signal*

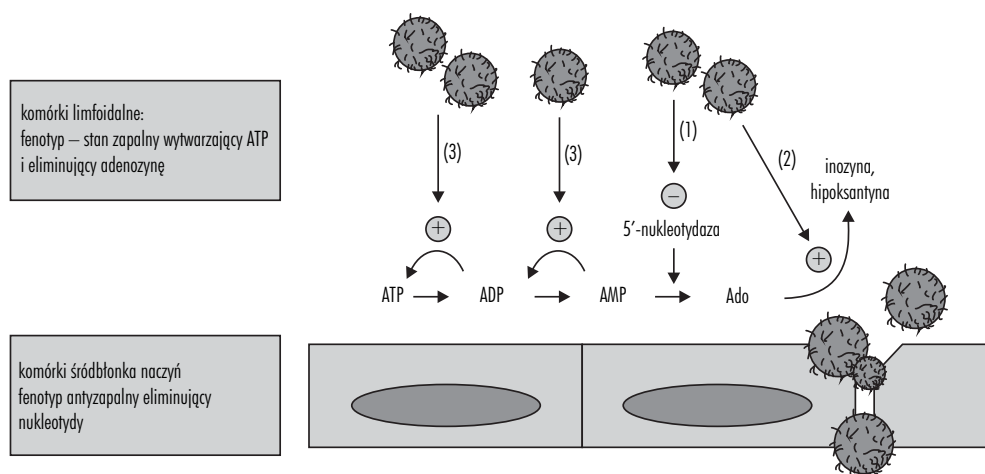
transducers and activator of transcription) (ryc. 2.) [49]. W pobudzonych limfocytach T ekspresja IL-2 wzrasta ponad 1000-krotnie [52]. Interleukina ta zwiększa zarówno proliferację, jak i aktywację i cytotoxiczność limfocytów T_c (cytotoksycznych). Jest również czynnikiem wzrostu dla limfocytów T pomocniczych i komórek NK oraz indukuje wytwarzanie innych cytokin, w tym IFN- γ [52]. Dlatego inhibicja syntezy IL-2 przez adenosynę hamuje także produkcję IFN- γ . Rola receptorów A₃ w regulacji aktywności limfocytów T nie została do końca poznana. Wiadomo jedynie, że aktywacja receptorów A₃ hamuje komórki NK [49]. Podsumowując – aktywacja obecnych na autoreaktywnych limfocytach T receptorów adenosynowych, które uczestniczą w indukcji procesów zapalnych w OUN, może hamować rozwój SR.

Udział puryn w migracji limfocytów przez śródbłonek naczyń do ośrodkowego układu nerwowego

Komórki limfoidalne i związane z nimi duże stężenie ATP oraz małe stężenie adenosyny w połączeniu z zależnym od leukocytów hamowaniem endotelialnej 5'-nukleotyduazy ułatwiają migrację adherentnych leukocytów do OUN. W warunkach fizjologicznych

enzymy związane z komórkami śródbłonna, takie jak NTPD-azy i 5'-nukleotyduaza, skutecznie degradują ATP i ADP do AMP, a następnie do adenosyny [53–56]. I odwrotnie, duża aktywność na powierzchni limfocytów kinaz nukleotydu, kinazy adenosyny i deaminazy adenosyny oraz ektonukleotyduazy i prawdopodobnie NTPD-azy 1 sprzyja resyntezie nukleotydu i zmniejsza stężenie pozakomórkowej adenosyny. Dzięki temu możliwe jest utrzymanie mikromolarnego stężenia ATP w pobliżu komórek limfoidalnych [9].

Podczas ostrego zapalenia i niedotlenienia dochodzi do wzrostu aktywności takich ektoenzymów, jak NTPD-aza 1 i ekto-5'-nukleotyduaza śródbłonna, które biorą udział w degradacji nukleotydu. Prowadzi to do zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia adenosyny oraz hamowania odpowiedzi zapalnej przez wpływ na adhezję i migrację limfocytów przez barierę śródbłonna. Zwiększające się stężenie pozakomórkowej adenosyny zmniejsza wychwytywanie zwrotny adenosyny, gdyż powoduje zmniejszenie ekspresji transporterów białkowych tego nukleozydu. Zwiększenie stężenia tego nukleozydu poza komórką i transkrypcji jej receptora prowadzi do intensyfikacji sygnalizacji za pośrednictwem receptorów adenosyny (ryc. 3.) [9].



Ryc. 3. Regulacyjna rola metabolizmu ektopuryn podczas adhezji leukocytów do komórek śródbłonna (zmodyfikowano na podstawie [9]). Podczas zapalenia migrację adherentnych komórek limfoidalnych przez śródbłonek ułatwiają następujące procesy: (1) duże stężenie pozakomórkowego ATP produkowanego przez migrujące limfocyty hamuje ekto-5'-nukleotyduazę na powierzchni komórek śródbłonna, co powoduje zmniejszenie stężenia adenosyny, (2) szybka eliminacja pozakomórkowej adenosyny przez deaminazę adenosyny, (3) utrzymywanie dużego stężenia prozapalnego ATP

Fig. 3. The metabolism of extracellular purines regulates the adhesion of leukocytes to endothelial cells (according to [9]). The inflammatory migration of adherent lymphocytes through endothelium is facilitated by: (1) high level of proinflammatory extracellular ATP produced by migrating lymphocytes and its inhibitory effect on ecto-5'-nucleotidase expressed at the surface of endothelial cells that result in inhibition of anti-inflammatory adenosine production, (2) rapid elimination of extracellular adenosine by adenosine deaminase, (3) maintenance of external levels of proinflammatory ATP at relatively high levels

Zmiany w ekspresji receptorów purynergicznych i metabolizmie nukleotydów adeninowych obserwowane u chorych na stwardnienie rozsiane

Już w 1980 r. w Polsce wykazano zmiany stężenia wolnych nukleotydów adeninowych w erytrocytach i aktywności ATP-azowej cieni krwinek czerwonych chorych na SR leczonych hormonem adrenokortykotropowym (*adrenocorticotropic hormone* – ACTH) [17]. Do dzisiaj nie ma jednak bezpośrednich dowodów wskazujących na udział nukleotydów i adenozyiny w etiologii SR.

Jedynymi dowodami sugerującymi udział puryn w powstawaniu SR są rezultaty badań na modelu zwierzęcym – w eksperymentalnym autoimmunologicznym zapaleniu mózgu i rdzenia (*experimental autoimmune encephalomyelitis* – EAE). Wyniki badań przeprowadzonych na oligodendrocytach wyhodowanych *in vitro* z komórek nerwu wzrokowego wykazały, że permanentna aktywacja receptorów P2X₇ prowadziła głównie do powstawania blaszek typowych dla SR, śmierci oligodendrocytów i uszkodzenia aksonów, natomiast użycie antagonistów tego receptora zmniejszało demielinizację [58–60].

Badania nad transgenicznymi myszami pozbawionymi ekspresji receptorów P2X₇ i ich dzikiego szczepu wykazały, że brak tych receptorów powoduje kompensacyjny wzrost cytokin produkowanych przez limfocyty T. Skutkiem tej zmiany był brak klinicznych objawów uszkodzenia komórek astrogleju. Powyższe obserwacje wskazują na istotną rolę receptora P2X₇ w etiologii EAE [61]. Również rezultaty eksperymentów z transgenicznymi myszami pozbawianymi receptora P2X₇ wskazują na istotną rolę tego receptora w zmniejszeniu apoptotycznej aktywności limfocytów [62]. Istnieją również badania wskazujące na wzmożoną immunoreaktywność receptora P2X₇ obecnego na aktywowanych komórkach mikrogleju/makrofagów rdzenia kręgowego chorych na SR, co sugeruje zwiększenie ekspresji tego receptora na ich powierzchni [27]. Zmniejsza się natomiast immunoreaktywność receptora P2Y₁₂ na oligodendrocytach w blaszkach demielinizacyjnych istoty szarej kory mózgu oraz podkorowo w istocie białej u chorych na SR. Oznacza to, że w tych komórkach ekspresja receptora P2Y₁₂ wyraźnie się zmniejsza [63]. Stwierdzono również, że u chorych na SR liczba receptorów A1AR zlokalizowanych na monocytach/makrofagach obecnych we krwi i w mózgu ulega wybiórczemu zmniejszeniu [64,65]. W osoczu chorych na SR stężenie TNF- α było znacznie większe, podczas gdy stężenie adenozyiny istotnie mniejsze w odnie-

sieniu do grupy kontrolnej. W tych samych badaniach wykazano, że w jednojądrzastych komórkach krwi chorych na SR agonista receptora adenozyiny A1-R – *phenylisopropyladenosine* (R-PIA), znacznie hamuje wytwarzanie TNF- α , ale nie IL-6, podczas gdy we krwi grupy kontrolnej znacząco hamuje produkcję IL-6, a nie TNF- α [65].

W modelu zwierzęcym SR, tzn. w EAE, wykazano, że metylotioadenozyina (MTA) aplikowana doustnie w pierwszym rzucie SR w połączeniu z IFN- β lub octanem glatirameru zwiększa skuteczność terapii [66]. W płynie mózgowo-rdzeniowym i w surowicy chorych na SR stwierdzono również wyraźny wzrost stężenia metabolitów ATP [67,68].

Istnieje również szereg innych badań sugerujących udział puryn w rozwoju tego schorzenia. U osób z SR obserwowano wyraźne zmiany aktywności ektonukleotydaz metabolizujących puryny. U chorych na SR leczonych zarówno interferonem IFN- β -1a, jak i IFN- β -1b stwierdzono wzrost ekspresji ekto-5'-nukleotydazy na komórkach śródbłonna i w surowicy. Interferon β powoduje również wzrost ekspresji ekto-5'-nukleotydazy na komórkach bariery krew–mózg oraz astrocytach. Zmiany te sugerują zmniejszenie stężenia AMP i zwiększenie stężenia pozakomórkowej adenozyiny podczas powyższej terapii i w konsekwencji ograniczenie migracji reaktywnych limfocytów przez barierę krew–mózg [69,70].

Ostatnie badania OUN wykazały obecność NTPD-az, głównie NTPD-azy 1, na błonach zakończeń nerwowych i na powierzchni komórek mikrogleju [5,49,53]. Enzym ten był znany jedynie jako marker aktywacji limfocytów B [53]. Wykazano również, że NTPD-aza 1 jest markerem komórek immunosupresyjnych Foxp3⁺ Treg [54]. Podczas zapalenia zwiększa się również ekspresja tego enzymu na komórkach NK, monocytach i aktywnych limfocytach T [8,55]. NTPD-azy uczestniczą także w kontrolowaniu niektórych funkcji limfocytów, takich jak rozpoznanie antygenów i aktywacja cytotoksycznych komórek T [56]. Oznacza to, że w procesach zapalnych enzymy te, degradując nukleotydy, mogą regulować ekspresję cytokin, procesy przylegania komórek, proliferację komórek i apoptozę. Na limfocytach pacjentów z postacią nawracająco-zwalniającą SR stwierdzono zwiększenie aktywności NTPD-az [40,57]. Powyższe badania wykazują, że wzrost stężenia ATP w przestrzeni pozakomórkowej podczas demielinizacji koreluje ze wzrostem aktywności i ekspresji NTPD-az limfocytów, co może stanowić jeden z mechanizmów kompensacyjnych uczestniczących w ha-

mowaniu procesu zapalnego, sprzyjających remielinizacji tkanki nerwowej [71].

W płytkach krwi pacjentów z postacią nawracająco-zwalniającą SR zaobserwowano również zmniejszenie aktywności NTPD-azy, pirofosfatazy/fosfodiesterazy nukleotydów (E-NPP), 5'-nukleotydu i deaminazy adenozyliny [40]. Zmiany te nie wpływały na proces agregacji płytek. Obserwacje te sugerują istotne zmiany w stężeniu nukleotydów i nukleozydów w tle płytek krwi, jednak trudno określić, czy mają one związek z etiologią SR.

Podsumowanie

Stwardnienie rozsiane jest przewlekłą zapalną chorobą OUN o nieznanym etiologii. Proces zapalny w SR stwierdza się na wszystkich etapach choroby, z wyraźnym defektem jego wygaszenia i samoograniczenia [60]. W pracy przedstawiono szereg wyników badań, które wskazują na udział w tym procesie sygnalizacji purynergicznej.

Wzrost pozakomórkowego stężenia ATP w OUN jest ważnym sygnałem ostrzegawczym (*danger signal*) wskazującym na inicjację procesów zapalnych i apoptozy. Ponadto wszelką wątpliwość w zmianach tych uczestniczą receptory P2X₇. Ich aktywacja skutkuje wydzielaniem IL-1 β , aktywującej prokaspazę 1, NOS, cyklooksygenazę 2 i TNF- α [24,30]. Adenozynotrifosforan znajdujący się poza komórką uruchamia również szereg innych procesów metabolicznych, w których uczestniczą takie enzymy i białka, jak fosfolipaza D, fosfolipaza A₂, NF- κ B i MAPK. W przerwaniu tego sygnału konieczna jest degradacja ATP aż do adenozyliny, która wykazuje silne działanie przeciwzapalne i immunosupresyjne [5].

Do degradacji ATP do adenozyliny niezbędne są aktywne enzymy uczestniczące w przemianie nukleotydów (NTPD-azy i 5'-nukleotydu) i jednocześnie warunki, w których zmniejszona jest aktywność deaminazy adenozyliny. Skutkiem tych zmian jest wyraźne zwiększenie stężenia pozakomórkowej adenozyliny. Badania chorych na SR wykazały istnienie naturalnych mechanizmów prowadzących do wzrostu pozakomórkowej adenozyliny. Limfocyty chorych z postacią nawracająco-zwalniającą SR charakteryzują się dużą aktywnością NTPD-az i zmniejszoną aktywnością deaminazy adenozyliny, co sprzyja procesom hamującym zapalenie. Te obserwowane w SR zmiany można uznać za mechanizm kompensacyjny w odpowiedzi na nasilenie procesów zapalnych. Powyższe zmiany obserwujemy również u chorych na SR leczonych IFN- β -1a i IFN- β -1b [58].

Innym sposobem zmniejszenia prozapalnego działania ATP może być zastosowanie antagonistów receptora P2X₇, co może zmniejszyć odpowiedź zapalną w OUN. Obecnie prowadzi się wiele badań nad potencjalnymi antagonistami receptora P2X₇ [24,31–33,72].

Istnieją dowody, że w trakcie odpowiedzi immunologicznej czynnikiem uszkadzającym tkankę nerwową jest upośledzenie mikrokrążenia. Skutkuje to lokalnym niedotlenieniem tkanek. Lokalna hipoksja tkanek przy jednoczesnym wzroście aktywności ektoenzymów i hamowaniu aktywności kinazy adenozyliny przyczynia się do znacznego zwiększenia stężenia adenozyliny w przestrzeni pozakomórkowej. Aktywacja przez adenozylinę obu receptorów adenozylinowych (A_{2A} i A_{2B}) hamuje proliferację limfocytów T oraz wydzielanie cytokin przez limfocyty T i komórki mikrogleju [40,57]. Aktywacja receptora A_{2A}, wymagająca mniejszych stężeń adenozyliny aniżeli aktywacja receptora A_{2B}, może wcześniej zintensyfikować działania immunosupresyjne. Aktywacja receptorów A₁ i A₃ skutkuje zmianami odwrotnymi do aktywacji receptorów A₂. Inhibicja tych receptorów powinna zatem powodować zmniejszenie aktywności limfocytów T, a tym samym wygaszenie procesów zapalnych.

Oświadczenie

Autorzy zgłaszają brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo

- Martino G., Adorini L., Rieckmann P. i wsp. Inflammation in multiple sclerosis: the good, the bad, and the complex. *Lancet Neurol* 2002; 1: 499-509.
- Siffrin V., Vogt J., Radbruch H. i wsp. Multiple sclerosis – candidate mechanisms underlying CNS atrophy. *Trends Neurosci* 2010; 33: 202-210.
- Di Virgilio F. Purinergic signaling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signal* 2007; 3: 1-3.
- Di Virgilio F., Ceruti S., Bramanti P. i wsp. Purinergic signalling in inflammation of the central nervous system. *Trends Neurosci* 2009; 2: 79-87.
- Sperlagh B., Illes P. Purinergic modulation of microglial cell activation. *Purinergic Signal* 2007; 3: 117-127.
- Kukulski F., Komoszyński M. E-NTPDazy – enzymy uczestniczące w procesach sygnalizacji w centralnym układzie nerwowym. *Postępy Biol Komorki* 2002; 3: 449-463.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002; 296: 301-305.
- Bours M., Swennen E., Serafini B. i wsp. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 358-404.

9. Yegutkin G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783: 673-694.
10. Kukulski F, Ben Yebdri F, Bahrami F i wsp. Endothelial P2Y2 receptor regulates LPS-induced neutrophil transendothelial migration in vitro. *Mol Immunol* 2010; 47: 991-999.
11. Gabel Ch. P2 purinergic receptor modulation of cytokine production. *Purinergic Signal* 2007; 3: 27-38.
12. Wang L., Jacobsen S., Bengtsson A. i wsp. P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34+ stem and progenitor cells. *BMC Immunol* 2004; 5: 1-7.
13. Sitkovsky M.V., Ohta A. The "danger" sensors that STOP the immune response: the A2 adenosine receptors? *Trends Immunol* 2005; 22: 299-304.
14. Sitkovsky M., Lukashev D., Apasov S. i wsp. Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 657-682.
15. Honda S., Sasaki Y., Ohsawa K. i wsp. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through G_{i/o}-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 2001; 21: 1975-1982.
16. Trautmann A. Extracellular ATP in immune system: more than a just a danger signal. *Sci Signal* 2009; 2: 1-3.
17. Chmielewski H., Maciejek Z., Lutz W. i wsp. Zmiany stężenia wolnych nukleotydów adeninowych w erytrocytach i aktywności ATP-azowej cieni krwinek czerwonych chorych na stwardnienie rozsiane leczonych ACTH. *Biuletyn WAM* 1980; 23: 71-78.
18. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007; 87: 659-797.
19. Burnstock G. Purine-mediated signaling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 4: 182-188.
20. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972; 24: 509-581.
21. Perregaux D., Gabel C.A. Interleukin1B maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* 1994; 269: 15195-15203.
22. Chakfe Y., Seguin R., Antel J. i wsp. ADP and AMP induce interleukin1-β release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channel. *J Neurosci* 2002; 22: 3061-3069.
23. Langston H., Ke Y., Gewirtz A. i wsp. Secretion of IL-2 and IFN-gamma but not IL-4 by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J Immunol* 2003; 170: 2962-2970.
24. Carroll W., Donnelly-Roberts D., Jarvis M. Selective P2X7 receptor antagonists for chronic inflammation and pain. *Purinergic Signal* 2009; 5: 63-73.
25. Skaper S., Debetto P., Giusti P. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J* 2009; 24: 337-345.
26. Yiangou Y., Facer P., Durrenberger P. i wsp. COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol* 2006; 2: 6-12.
27. Duan S., Anderson C.M., Keung E.C. i wsp. P2X7 Receptor-mediated release of excitatory amino acid from astrocytes. *J Neurosci* 2003; 23: 1320-1328.
28. Lister M., Sharkey J., Sawatzky D. i wsp. The role of purinergic P2X7 receptor in inflammation. *J Inflammation* 2007; 4: 5.
29. Hughes J., Hatcher J., Chessell I. The role of P2X7 in pain and inflammation. *Purinergic Signal* 2007; 3: 163-169.
30. Narcisse L., Scemes E., Zhao Y. i wsp. The cytokine IL-1β transiently enhances P2X7 receptor expression and function in human astrocytes. *Glia* 2005; 49: 245-258.
31. Friedle S.A., Curet M.A., Watters J.J. Recent patents on P2X(7) receptor antagonist and their potential for reducing central nervous system inflammation. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2010; 5: 35-45.
32. Baxter A., Bent J., Bowers K. i wsp. Hit-to-lead studies: the discovery of potent adamantane amid P2X7 receptor antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 4047-4050.
33. Romagnoli R., Baraldi P.G., Di Virgilio F. Recent progress in the discovery of antagonists acting at P2X7 receptor. *Expert Opin Ther Pat* 2005; 15: 271-287.
34. Schnurr M., Toy T., Shin A. i wsp. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood* 2005; 105: 1582-1589.
35. Conigrave A.D., Fernando K.C., Gu B. i wsp. P2Y(11) receptor expression by human lymphocytes: evidence for two cAMP-linked purinoreceptors. *Eur J Pharmacol* 2001; 426: 157-163.
36. Ecke D., Fischer B., Reiser G. Diastereoselectivity of the P2Y11 nucleotide receptor: mutation analysis. *Br J Pharmacol* 2008; 155: 1250-1255.
37. Marteau F., Comni D., Boeynaems J.-M. i wsp. Involvement of multiple P2Y receptors and signaling pathways in the action of adenine nucleoside diphosphates on human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 796-803.
38. Nowak J., Zawilska J. Receptory i mechanizmy przekazywania sygnału. *PWN*, Warszawa 2004.
39. Stone T.W., Cerutti S., Abbracchio M.P. Adenosine receptors and neurological disease: neuroprotection and neurodegeneration. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 193: 535-587.
40. Spanevello R.M., Mazzanti C.M., Bagatini M. i wsp. Activities of the enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from multiple sclerosis patients. *J Neurol* 2010; 257: 24-30.
41. Abbracchio M., Ceruti S. P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signal* 2007; 3: 13-25.
42. Tsutsui S., Schnermann J., Noorbakhsh F. i wsp. A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 2004; 24: 1521-1529.
43. Braun N., Lenz C., Gillardon F. i wsp. Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase. *Brain Res* 1997; 766: 213-226.
44. Hasko G., Pachwer P., Vizi E.S. Adenosine receptor signaling in the brain immune system. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26: 511-516.
45. Ciccarelli R., Di Iorio P., Bruno F. i wsp. Activation of A1 adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S-100β protein from cultured astrocytes. *Glia* 1999; 27: 275-281.
46. Schwaninger M., Neher M., Viegas E. i wsp. Stimulation of interleukin-6 secretion and gene transcription in primary astrocytes by adenosine. *J Neurochem* 1997; 69: 1145-1150.

47. Johnston J.B., Silva C., Gonzalez G. i wsp. Diminished adenosine A1 receptor expression on macrophages in brain and blood of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 49: 650-658.
48. Wittendorp M.C., Boddeke H.W., Biber K. Adenosine A3 receptor induced CCL2 synthesis in cultured mouse astrocytes. *Glia* 2004; 46: 410-418.
49. Gessi S., Varani K., Merighi S. i wsp. Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signal* 2007; 3: 109-116.
50. Franco R., Casado V., Ciruela F. i wsp. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol* 1997; 52: 283-292.
51. Vivekanandhan S., Soundararajan C., Tripathi M. i wsp. Adenosine deaminase and 5'-nucleotidase activities in peripheral blood T cell of multiple sclerosis patients. *Neurochem Res* 2005; 30: 453-456.
52. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W. i wsp. Immunologia. PWN, Warszawa 2008.
53. Robson S., Sevigny J., Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006; 2: 409-430.
54. Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D. i wsp. Expression of ectonucleotidase CD39 by Fox3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007; 110: 1225-1232.
55. Pulte E., Broekman M., Olson K. i wsp. CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leucocytes. *Thromb Res* 2007; 121: 309-317.
56. Dwyer K., Deaglio S., Gao W. i wsp. CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signal* 2007; 3: 171-180.
57. Spanevello R., Mazzanti C., Schmatz R. i wsp. The activity expression of NTPDase is altered in lymphocytes of multiple sclerosis patients. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 210-214.
58. Matute C. Glutamate and ATP signalling in white matter pathology. *J Anat* 2011; 219: 53-64.
59. Matute C., Torre I., Pérez-Cerdá F. P2X(7) receptor blockade prevents ATP excitotoxicity in oligodendrocytes and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 2007; 27: 9525-9533.
60. Matute C., Cavaliere F. Neuroglial interactions mediated by purinergic signalling in the pathophysiology of CNS disorders. *Semin Cell Dev Biol* 2011; 22: 252-259.
61. Sharp A.J., Polak P.E., Simonini V. i wsp. P2X7 deficiency suppresses development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 2008; 8: 33.
62. Chen L., Brosnan C.F. Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in P2X7R^{-/-} mice: evidence for loss of apoptotic activity in lymphocytes. *J Immunol* 2006; 176: 3115-3126.
63. Amadio S., Montilli C., Magliozzi R. i wsp. P2Y12 receptor protein in cortical gray matter lesions in multiple sclerosis. *Cereb Cortex* 2010; 20: 1263-1273.
64. Johnston J.B., Silva C., Gonzalez G. i wsp. Diminished adenosine A1 receptor expression on macrophages in brain and blood of patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; 49: 650-658.
65. Mayne M., Shepel P.N., Jiang Y. i wsp. Dysregulation of adenosine A1 receptor-mediated cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 1999; 45: 633-639.
66. Moreno B., Fernandez-Diez B., Di Penta A. i wsp. Preclinical studies of methylthioadenosine for the treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010; 16: 1102-1108.
67. Amorini A.M., Petzold A., Tavazzi B. i wsp. Increase of uric acid and purine compounds in biological fluids of multiple sclerosis patients. *Clin Biochem* 2009; 42: 1001-1006.
68. Lazzarino G., Amorini A.M., Eikelenboom M.J. i wsp. Cerebrospinal fluid ATP metabolites in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010; 16: 549-554.
69. Airas L., Niemela J., Yegutkin G. i wsp. Mechanism of action of IFN- β in the treatment of multiple sclerosis. A special reference to CD73 and adenosine. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1110: 641-648.
70. Niemala J., Ifergan I., Yegutin G. i wsp. IFN-beta regulates CD73 and adenosine expression at the blood-brain barrier. *Eur J Immunol* 2008; 38: 2718-2726.
71. Foote A.K., Blakemore W.F. Inflammation stimulates remyelination in areas of chronic demyelination. *Brain* 2005; 128: 528-539.
72. Merriman G.H., Ma I., Shum P. i wsp. Synthesis and SAR of novel 4,5-diarylimidazolines as potent P2X7 receptor antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15: 435-438.