ROLA NUKLEOTYDÓW I SYGNALIZACJI PURYNERGICZNEJ W STENOZIE AORTALNEJ I MIAŻDŻYCY TĘTNIC

PURINERGIC SIGNALING IN AORTIC STENOSIS AND ATHEROSCLEROSIS

Barbara KUTRYB-ZAJĄC, Ryszard T. SMOLEŃSKI

Katedra i Zakład Biochemii, Gdański Uniwersytet Medyczny

Streszczenie: Schorzenia układu sercowo-naczyniowego przebiegające ze zwężeniem zastawki aortalnej i/lub miażdżycą tętnic są jedną z głównych przyczyn śmiertelności w krajach rozwiniętych. Badania dowodzą, że w ich rozwój zaangażowane są aktywne procesy związane z funkcjami regulacyjnymi i metabolicznymi komórki. Patogenezę zwężenia zastawki aortalnej i miażdżycy charakteryzuje wiele podobieństw, w tym uszkodzenie śródbłonka, proces zapalny, akumulacja zmodyfikowanych lipoprotein oraz przebudowa macierzy pozakomórkowej. Ze względu na różnice w budowie ściany naczynia oraz zastawki, istnieją także znaczące rozbieżności w patogenezie tych chorób. W miażdżycy, kluczową rolę odgrywają akumulujące się w ścianie naczynia lipidy oraz proliferujące komórki mięśniówki gładkiej przyczyniające się do rozkładu elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Rozwój stenozy aortalnej uzależniony jest natomiast od różnicowania komórek zastawki w komórki miofibroblasto- i osteoblastopodobne. Te ostatnie odgrywają bezpośrednią rolę w kalcyfikacji.

Podejście chirurgiczne jest obecnie jedyną efektywną metodą leczenia stenozy aortalnej i zaawansowanej miażdżycy. W przypadkach wczesnych zmian miażdżycowych z sukcesem wykorzystywana jest profilaktyka i farmakoterapia, które niestety nie znajdują zastosowania w leczeniu stenozy aortalnej. Podkreśla to konieczność poszukiwania innych możliwości terapeutycznych, przede wszystkim w zakresie działania na śródbłonek, regulacji stanu zapalnego oraz różnicowania i proliferacji specyficznych podtypów komórek.

Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymywanie homeostazy w układzie sercowo-naczyniowym, o znaczącym potencjale terapeutycznym, jest sygnalizacja purynergiczna. Uwalniane z komórek nukleotydy i powstające na drodze zewnątrzkomórkowej hydrolizy, katabolity nukleotydów pełnią funkcje cząstek sygnałowych regulujących proces zapalny, agregację płytek, skurcz naczyń, proliferację komórek i przebudowę kości. Efekty działania tych substancji wywierane są poprzez aktywację receptorów purynergicznych, występujących w praktycznie każdym typie komórek, w tym w znaczących ilościach na komórkach naczyń, zastawek i krwi obwodowej.

Celem niniejszego opracowania było omówienie komórkowych i molekularnych aspektów patofizjologii stenozy aortalnej i miażdżycy, a w szczególności roli sygnalizacji purynergicznej oraz enzymów zaangażowanych w regulację zewnątrzkomórkowych stężeń nukleotydów i ich katabolitów. Ponadto, w pracy przedstawiono możliwości farmakologicznej modyfikacji sygnalizacji purynergicznej przez wpływ na aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów metabolizmu nukleotydów/adenozyny.

Słowa kluczowe: stenoza aortalna, miażdżyca, nukleotydy, adenozyna, ATP

Summary: Aortic stenosis and atherosclerosis are active processes that lead to cardiac failure and organ hypoxia. Their pathophysiology shares many similarities, including endothelial activation, inflammation, accumulation of modified lipoproteins and extracellular matrix remodeling. However, there are important differences in the pathology of these diseases. In atherosclerosis, the most important role is played by accumulating lipids and proliferating vascular smooth muscle cells that contribute to degrade extracellular matrix components. In turn, the development of aortic stenosis depends on the differentiation of valvular interstitial cells into myofibroblast- and osteoblast-like cells that are the main cause of the aortic valve mineralization.
Currently, a surgical approach is the only method for aortic stenosis and severe atherosclerosis treatment. The prevention and pharmacotherapy are successfully used in mild atherosclerosis. Unfortunately, these are not beneficial in aortic stenosis. This highlights the need for other therapeutic options, especially in the field of endothelial protection, regulation of inflammation or proliferation and differentiation of specific cell types.
One of the most important mechanisms of the cardiovascular system homeostasis, with significant therapeutic potential, is the purinergic signaling. Nucleotides released form the cells and their catabolites, originated from extracellular nucleotide hydrolysis, act as signaling molecules that regulate inflammation, platelet aggregation, vasoconstriction, cell proliferation and bone remodeling. These effects are exerted by the activation of purinergic receptors that are present in all types of cells but are especially important in the cardiovascular system, including vascular, valvular cells and peripheral blood cells.
The aim of this review was to discuss cellular and molecular aspects of the pathophysiology of aortic stenosis and atherosclerosis with particular importance of purinergic signaling and enzymes involved in control of extracellular concentrations of nucleotides and their catabolites. Furthermore, this review summarized potential for pharmacological modulation of purinergic signaling by modifications of nucleotide-converting ecto-enzyme activities.

Key words: aortic stenosis, atherosclerosis, nucleotides, adenosine, ATP

EPIDEMIOLOGIA CHORÓB UKŁADU SERCOWO-NACZYNIOWEGO

Schorzenia układu sercowo-naczyniowego, takie jak miażdżyca tętnic, patologie zastawkowe oraz nadciśnienie tętnicze, są jedną z głównych przyczyn śmiertelności w krajach rozwiniętych [164]. Miażdżyca, prowadząc do długotrwałego lub ostrego niedotlenienia narządów, powoduje w Polsce blisko 30 000 zgonów rocznie [162]. Z kolei, stenoza zastawki aortalnej (zwężenie/stenoza le-

wego ujścia tętniczego, stenoza aortalna), jest najczęstszą patologią zastawkową, przyczyniającą się do rozwoju niewydolności mięśnia sercowego. Ze względu na przyczynę, możemy wyróżnić degeneracyjne, reumatyczne oraz wrodzone zwężenie zastawki aortalnej [97]. Na skutek zmian demograficznych, starzenia się populacji i szerokich możliwości terapeutycznych chorób infekcyjnych, większość obecnie diagnozowanych wad zastawkowych wywodzi się ze zmian o charakterze degeneracyjnym. Obecnie u ok. 2-7% populacji >65. roku życia stwierdza się degeneracyjno-zwapnieniową stenozę zastawki aortalnej [56]. W Stanach Zjednoczonych co roku hospitalizowanych jest 100 000 chorych z zastawkowymi wadami serca, z czego ponad 20 000 umiera [123]. Również w Europie, w tym także w Polsce, systematycznie wzrasta liczba chorych z objawowym zwężeniem zastawki aortalnej [118]. Początkowo uważano, że jest to proces zwyrodnieniowy, charakterystyczny dla starzenia się. Jednak aktualne badania dowodzą, że rozwój stenozy aortalnej, podobnie jak miażdżycy tętnic, jest procesem aktywnym, podlegającym regulacji komórkowej [119].

PATOGENEZA ORAZ LECZENIE CHORÓB UKŁADU SERCOWO-NACZYNIOWEGO

STENOZA AORTALNA

Rosnąca liczba doniesień dotyczących patogenezy degeneracyjnej stenozy aortalnej dowodzi, że zmiany prowadzące do zwapnienia zastawki rozwijają się na podłożu zapalnym [93]. Histologiczna ocena płatków zastawki na etapie poprzedzającym rozwój zwapnień wykazała obecność infiltratu komórek zapalnych, złożonego przede wszystkim z limfocytów T oraz makrofagów [141]. Ponadto, w strukturze zastawki wykazano obecność złogów lipidowych oraz zmian charakterystycznych dla przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej [86]. Powstająca na kolejnych etapach rozwoju stenozy aortalnej, tkanka kościopodobna, złożona jest głównie z akumulujących się w strukturze zastawki depozytów hydrokysapatytu, co koreluje z lokalnym wzrostem ekspresji białek macierzy kostnej [120].

Kryteria klasyfikacji stenozy aortalnej z wykorzystaniem echokardiograficznej techniki doplerowskiej opierają się o pomiar pola powierzchni ujścia aorty, średniego gradientu ciśnień oraz maksymalnej prędkości przepływu przez zastawkę [110]. Klasyfikacja zaawansowania stenozy aortalnej, stan lewej komory serca oraz występowanie objawów klinicznych są podstawowymi kryteriami kwalifikacji pacjentów do zabiegu operacyjnej wymiany zastawki aortalnej, bądź jej przezcewnikowej implantacji [44]. Obecnie podejście chirurgicznie jest jedyną efektywną metodą leczenia stenozy aortalnej. Jej istotną wadą jest późna kwalifikacja do zabiegu, co niejednokrotnie skutkuje doprowadzeniem pacjenta do

schyłkowego stadium choroby. W obliczu braku prewencji i farmakoterapii stenozy aortalnej, badanie molekularnych i komórkowych mechanizmów leżących u podstaw tej patologii, a także poszukiwanie czynników zaangażowanych w ich regulację ma kluczowe znaczenie.

MIAŻDŻYCA TĘTNIC

Miażdżyca jest przewlekłą chorobą naczyń, polegającą na zmianach wytwórczych i zwyrodnieniowych w błonie wewnętrznej i środkowej tętnic. W przeciwieństwie do stenozy aortalnej, patogeneza miażdżycy jest dobrze poznana. Na początkowych etapach jej rozwoju dochodzi do uszkodzenia śródbłonka naczyniowego, do którego predysponuje nadciśnienie, hiperglikemia i podwyższone stężenie lipoprotein o niskiej gęstości w surowicy (ang. *Low Density Lipoprotein*, LDL). Uszkodzenie śródbłonka inicjuje rozwój stanu zapalnego, który stymuluje naciek makrofagów, powiązany z akumulacją utlenionych lipoprotein. Procesom odkładania lipidów w ścianie naczynia towarzyszy rozrost fibroblastów i komórek mięśniówki gładkiej [76]. Prowadzi to do powstania i narastania zawężającej tętnicę blaszki miażdżycowej. Oderwane fragmenty blaszki oraz przepływające przez zwężone światło tętnicy skrzepliny, są najczęstszą przyczyną jej niedrożności, co w konsekwencji prowadzi do niedotlenienia organów. Obecnie jedynym środkiem zaradczym dla pacjentów z zaawansowanymi zmianami miażdżycowymi jest leczenie chirurgiczne, polegające na operacyjnym usunięciu blaszki miażdżycowej, angioplastyce (poszerzeniu tętnicy i rozpłaszczeniu blaszki) lub wszczepianiu protez naczyniowych. W przypadku wczesnych i średniozaawansowanych zmian, zastosowanie znajduje profilaktyka i farmakoterapia, których celem jest normalizacja parametrów profilu lipidowego, nadciśnienia i/lub zaburzeń w układzie krzepnięcia [155]. Z punktu widzenia oceny ryzyka, profilaktyki i intensyfikacji leczenia miażdżycy istotne są wczesne markery uszkodzenia naczyń/procesu miażdżycowego, co podkreśla istotę badań nad komórkowymi i molekularnymi mechanizmami tej choroby.

PODOBIEŃSTWA STENOZY AORTALNEJ I MIAŻDZYCY TĘTNIC

CZYNNIKI RYZYKA

U ok. 40% chorych ze zwężeniem zastawki aortalnej występują również zmiany miażdżycowe w tętnicach [56]. Najnowsze zalecenia Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego podkreślają analogię czynników ryzyka stenozy zastawki

aortalnej i miażdżycy tętnic, takich jak wiek, płeć męska, dyslipidemia (obejmująca wzrost stężenia cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL, triacyloglicerolі i lipoproteiny a w surowicy), nadciśnienie tętnicze, cukrzycę oraz zaburzenia krzepnięcia [147]. Obecność zespołu metabolicznego, będącego niezależnym czynnikiem rozwoju miażdżycy, związana jest z dwukrotnie szybszym rozwojem stenozy aortalnej [16]. Wykazano również pozytywną zależność między stężeniem cholesterolu LDL, a progresją zwapnień, zarówno w tętnicach wieńcowych, jak i w zastawce aortalnej [116].

PATOFIZJOLOGIA

Uszkodzenie śródbłonka

Wyniki badań eksperymentalnych również wykazują wiele analogii w mechanizmach rozwoju stenozy zastawki aortalnej oraz miażdżycy tętnic. Podobieństwa te dotyczą przede wszystkim wczesnych etapów rozwoju obu patologii, w tym uszkodzenia śródbłonka. Uszkodzenie śródbłonka naczyniowego może mieć charakter mechaniczny (przepływ turbulentny, nadciśnienie tętnicze), bądź czynnościowy (w przypadku dyslipidemii, niedotlenienia) [32]. Komórki śródbłonka znajdujące się w miejscach rozgałęzień tętnic oraz wyścielające stronę aortalną zastawki są narażone na działanie niekorzystnej siły mechanicznej, wywieranej przez turbulentny (wzburzony) przepływ krwi [30]. Znajduje to analogię z lokalizacją wczesnych zmian miażdżycowych w rozgałęzieniach tętniczych oraz odkładaniem zwapnień głównie po aortalnej stronie zastawki. Pomimo laminarnego (warstwowego, uporządkowanego) przepływu krwi w naczyniach prostych, na skutek zwiększonej prędkości przepływającej krwi (np. w nadciśnieniu tętniczym lub przy zwężeniu średnicy światła naczynia) może dochodzić do zmiany charakteru przepływu na turbulentny. Turbulentny przepływ krwi predysponuje ponadto do wydłużonej ekspozycji śródbłonka na czynniki promujące jego czynnościowe uszkodzenie, takie jak lipoproteiny LDL czy zewnątrzkomórkowe nukleotydy. Następnie, cząsteczki LDL dyfundują pod warstwę komórek śródbłonka, gdzie dochodzi do ich akumulacji i modyfikacji [114]. Najistotniejszą modyfikacją cząsteczek LDL jest ich oksydacja (utlenianie), podczas której dochodzi do powstania utlenionych cząsteczek LDL [60]. Gromadzące się zmodyfikowane lipoproteiny stymulują komórki śródbłonka do produkcji i eksternalizacji cząsteczek adhezyjnych, co prowadzi do rozwoju reakcji zapalnej [81].

Na skutek analogicznych mechanizmów dochodzi do akumulacji utlenionych cząsteczek LDL i uruchomienia kaskady zapalnej w obrębie zastawki [94]. Jak opisano powyżej, dynamika przepływu krwi przez zastawkę determinuje bezpośrednio (uszkodzenie mechaniczne) oraz pośrednio (uszkodzenie czynnościowe przez wydłużoną ekspozycję na czynniki prostenotyczne) lokalizację patologicznych zmian w jej strukturze [106].

Stan zapalny

Wzrost ekspresji cząsteczek adhezyjnych (selektyny P i E, ICAM-1, VCAM-1), produkowanych przez śródbłonek w odpowiedzi na jego aktywację, stymuluje przyleganie i infiltrację leukocytów do błony wewnętrznej ściany naczynia oraz strony aortalnej zastawki. Ponadto, aktywowane komórki śródbłonka syntetyzują czynniki stymulujące akumulację samych monocytów, takie jak białko chemotaksji monocytów (MCP 1) i czynnik aktywacji kolonii makrofagów (MCSF). Gromadzące się w przestrzeni podśródbłonkowej zmodyfikowane lipoproteiny również stanowią sygnał chemotaktyczny dla monocytów, które ulegają przekształceniu w makrofagi, posiadające na swojej powierzchni receptory zmiatające (ang. *scavenger receptors*). Makrofagi pochłaniając zmodyfikowane cząsteczki LDL stają się tzw. komórkami piankowatymi, których obecność potwierdzono zarówno w toku rozwoju procesu miażdżycowego, jak i w stenozie zastawki aortalnej [88]. Nadtrawione przez makrofagi cząsteczki utlenionych LDL, zostają przez nie „przedstawione" inflitrującym limfocytom T [49]. Dochodzi do interakcji receptora CD40, znajdującego się na makrofagach z limfocytowym ligandem CD40L, co rozpoczyna klasyczną reakcję immunologiczną, będącą bodźcem do odpowiedzi zapalnej. O tym, że miażdżyca jest przewlekłą chorobą zapalną, w większości zapoczątkowaną i stymulowaną przez hipercholesterolemię nie ma wątpliwości od co najmniej kilkunastu lat [129]. Natomiast, udział procesów zapalnych w rozwoju stenozy aortalnej potwierdza podwyższony poziom markerów stanu zapalnego u osób z szybszą progresją choroby [132], zwiększone uwalnianie cytokin prozapalnych przez patologicznie zmienione zastawki aortalne [50] oraz naciek komórek zapalnych w ich strukturze [141]. Również niepublikowane wyniki badań naszego zespołu wykazały obecność komórek zapalnych w stenotycznych zastawkach aortalnych, głównie subpopulacji limfocytów T pomocniczych oraz makrofagów [71].

Przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej

Na dalszych etapach rozwoju miażdżycy i stenozy aortalnej dochodzi do indukcji procesu włóknienia. Komórki śródbłonka, mięśniówki gładkiej, fibroblasty, a przede wszystkim obecne w strukturze tkanek infiltrujące limfocyty T i makrofagi produkują metaloproteinazy. Są to enzymy proteolityczne, degradujące białka macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak kolagen, proteoglikany, fibronektynę oraz elastynę. Ekspresja i aktywność metaloproteinaz regulowana jest na wielu poziomach, w tym na poziomie transkrypcji i aktywacji proenzymu przez zaburzenia hemodynamiczne, stan zapalny oraz stres oksydacyjny. Metaloproteinazy pełnią szczególną rolę w powstawaniu zmian miażdżycowych w naczyniu i zwapnień w zastawce poprzez ułatwianie migracji komórek budujących te tkanki (komórki mięśniówki gładkiej, fibroblasty, komórki śródmiąższowe zastawki), jak również komórek zapalnych, penetrujących ich strukturę [39].

RÓŻNICE STENOZY AORTALNEJ I MIAŻDŻYCY TĘTNIC

W przebiegu stenozy zastawki aortalnej oraz miażdżycy tętnic istnieją również istotne różnice. Przede wszystkim, u części osób z chorobą wieńcową nie występuje stenoza aortalna. Ponadto, w przebiegu choroby wieńcowej może dochodzić do pęknięcia lub erozji blaszki miażdżycowej, a w konsekwencji do ostrego zespołu wieńcowego, czego nie obserwujemy w stenozie aortalnej. Również, terapie skuteczne w leczeniu miażdżycy nie przynoszą zadowalających efektów u pacjentów ze stenozą. Oznacza to, że mimo wielu podobieństw, część z procesów leżących u podstaw stenozy aortalnej jest niezależna od procesów etiologicznych miażdżycy tętnic.

BUDOWA ANATOMICZNA ŚCIANY TĘTNICY I ZASTAWKI AORTALNEJ

Część różnic w procesach patofizjologicznych stenozy aortalnej i miażdżycy może wynikać z odmienności w budowie anatomicznej oraz składzie komórkowym ściany tętnicy i zastawki aortalnej.

Warstwę wewnętrzną ściany tętnicy (łac. *intima*) tworzą komórki śródbłonka, tkanka łączna składająca się z kolagenu i proteoglikanów oraz błona sprężysta wewnętrzna złożona z włókien elastyny. Warstwa środkowa (łac. *media*) składa się z koncentrycznie ułożonych blaszek sprężystych i znajdujących się między nimi komórek mięśniówki gładkiej (tętnice typu sprężystego), bądź ciasno upakowanych, ułożonych okrężnie, komórek mięśniówki gładkiej, którym towarzyszy niewielka ilość włókien sprężystych, biegnących promieniście od blaszki sprężystej zewnętrznej (w przypadku tętnic typu mięśniowego). Zewnętrzna warstwa naczynia (łac. *adventitia*), składa się z włókien kolagenowych i sprężystych, fibroblastów, włókien nerwowych i własnej sieci naczyniowej (łac. *vasa vasorum*) [142].

Przekrój poprzeczny przez zastawkę aortalną charakteryzuje się natomiast obecnością warstwy aortalnej (łac. *fibrosa*), środkowej (łac. *spongiosa*) oraz leżącej po stronie lewej komory serca (łac. *ventricularis*). Powierzchnia obu stron płatków zastawki wyścielona jest komórkami śródbłonka zastawkowego (ang. *ValvularEndothelial Cells*, VEC), które różnią się od śródbłonka tętniczego prostopadłym ułożeniem względem przepływu krwi [24]. Podstawowymi komórkami budującymi wnętrze zastawki aortalnej są komórki śródmiąższowe zastawki aortalnej (ang. *Valvular Interstitial Cells*, VIC), leżące w macierzy zewnątrzkomórkowej. Fenotypowo, komórki śródmiąższowe wykazują cechy fibroblastów i miofibroblastów, stąd określane są mianem komórek fibroblastopodobnych. Wraz ze znajdującymi się w strukturze zastawki nielicznymi komórkami mięśniówki gładkiej, komórki śródmiąższowe biorą udział w procesie wytwarzania,

konserwacji i naprawy macierzy zewnątrzkomórkowej, złożonej z elastyny, kolagenu i proteoglikanów [156]. Warstwowy podział zastawki aortalnej opiera się głównie o różnice w składzie macierzy zewnątrzkomórkowej. *Fibrosa* zbudowana jest z włókien kolagenowych ułożonych koncentrycznie, co nadaje jej największą wytrzymałość. Zajmująca 60-90% grubości płatka, gąbczasta *spongiosa* jest bogata w proteoglikany i glikozaminoglikany, działające amortyzująco podczas cyklu pracy serca. Z kolei, *ventricularis* złożona jest z rozmieszczonej promieniście elastyny, nadającej zastawce elastyczność.

PATOFIZJOLOGIA

Na skutek wydzielanych przez makrofagi czynników wzrostowych, np. płytkowego (PDGF) lub insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF1) dochodzi do stymulacji proliferacji komórek. W ścianie naczynia istotną rolę odgrywa migracja komórek mięśniówki gładkiej do błony wewnętrznej oraz ich proliferacja, z różnicowaniem w fenotyp sekrecyjny. Nabycie fenotypu sekrecyjnego przez te komórki umożliwia im syntezę kolagenu i proteoglikanów, co przyczynia się do reorganizacji macierzy zewnątrzkomórkowej i przebudowy ściany naczynia [138]. Ponadto, syntetyzowane elementy tkanki łącznej pokrywając jądro lipidowe, złożone z obumierających komórek piankowatych, tworzą włóknisto-tłuszczową stabilną blaszkę miażdżycową. Uwalniane wówczas przez makrofagi metaloproteinazy, rozkładając białka macierzy zewnątrzkomórkowej, predysponują do rozwoju niestabilnej blaszki miażdżycowej [138]. Pękanie i erozja blaszki są główną przyczyną ostrego zespołu wieńcowego, czego nie obserwuje się w stenozie aortalnej.

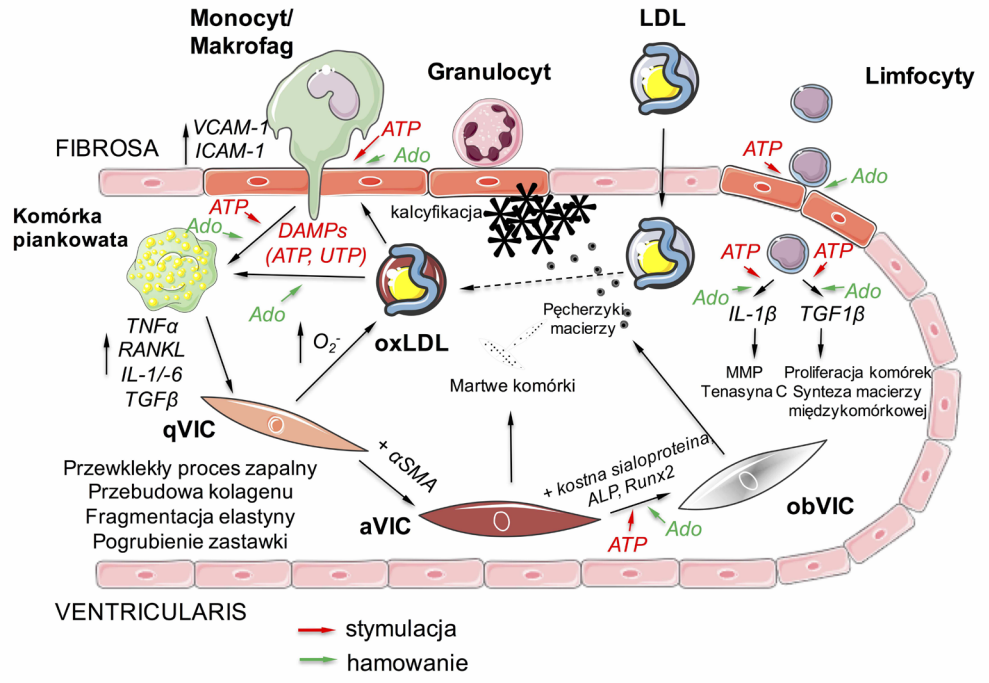
Z powodu znacznie mniejszej ilości komórek mięśniówki gładkiej w strukturze zastawki, ich migracja i proliferacja nie odgrywa tak istotnej roli jak w ścianie naczynia. Jednakże, w tym przypadku kluczowe okazuje się różnicowanie i proliferacja fibroblastopodobnych komórki śródmiąższowych. Bodźce zapalne i czynniki wzrostu stymulują do aktywacji komórki śródmiąższowe, które odpowiadają za zwiększoną produkcję macierzy zewnątrzkomórkowej oraz jej przebudowę [77]. Markerem aktywacji komórek śródmiąższowych jest nabycie ekspresji alfa-aktyny mięśniówki gładkiej (ang. *activated-VIC*, aVIC). Równolegle, stymulacja cytokinami, zewnątrzkomórkowymi nukleotydami oraz zmodyfikowanymi lipoproteinami LDL i pojawiającymi się białkami związanymi z chondro- i osteogenezą, doprowadza do różnicowania w osteoblastopodobne śródmiąższowe komórki zastawki aortalnej (ang. *osteoblast-like-VIC*, obVIC), będące bezpośrednią przyczyną odkładania zwapnień [41].

FARMAKOTERAPIA

Uwzględniając podobne procesy zaangażowane w rozwój miażdżycy tętnic i stenozy aortalnej, przeprowadzono próby efektywności leczenia przeciwmiażdżycowego w hamowaniu progresji choroby zastawkowej. Jedną z głównych grup leków zapobiegających rozwojowi miażdżycy są statyny, inhibitory reduktazy HMG CoA – kluczowego enzymu biorącego udział w syntezie cholesterolu [13]. Zmniejszona biosynteza cholesterolu w wątrobie prowadzi do spadku stężenia wolnego cholesterolu w komórkach i wtórnego wzrostu aktywności receptorów LDL biorących udział w katabolizmie cząsteczek LDL i remnantów VLDL (ang. *Very Low-Density Lipoproteins*) z krążenia. Dlatego nadrzędnym efektem tej grupy leków w terapii dyslipidemii jest zmniejszenie ilości cząsteczek LDL w surowicy. Ponadto, poza hipolipemizującym działaniem statyn, wykazano efekty wykraczające poza redukcję stężenia cholesterolu (tzw. efekty plejotropowe). Plejotropowe działanie statyn wynika z hamowania biosyntezy intermediatów szlaku syntezy cholesterolu, zaangażowanych w procesy prowadzące do poprawy funkcji śródbłonka, stabilizacji blaszki miażdżycowej, hamowania zapalenia, zmniejszenia aktywności metaloproteinaz, a w konsekwencji zapobiegania przerostowi mięśnia sercowego [2].

Początkowe badania nad wpływem statyn na rozwój stenozy aortalnej dawały obiecujące wyniki. W eksperymentalnym modelu zwierzęcym wykazano, że leczenie atorwastatyną hamuje progresję zwapnień w zastawce aortalnej [121]. Ponadto zastosowanie rosurwastatyny u pacjentów z łagodną i umiarkowaną stenozą skutkowało wolniejszą progresją rozwoju choroby [100]. W innej grupie pacjentów, spośród których część otrzymywała statyny, część była leczona inhibitorami konwertazy angiotensyny, a część obydwoma typami leków, tylko u pacjentów zażywających statyny zaobserwowano wolniejszą progresję stenozy aortalnej [128]. Obserwowany efekt wykazano u pacjentów zarówno z łagodną, jak i umiarkowaną oraz zaawansowaną stenozą aortalną. Zastosowanie inhibitorów konwertazy angiotensyny ani nie spowolniło postępów choroby, ani nie nasiliło korzystnego efektu działania statyn. Najciekawszym wynikiem tych badań był jednak brak zależności pomiędzy stężeniem cholesterolu w surowicy, a progresją zwężenia zastawki aortalnej, zarówno u pacjentów leczonych, jak i nieleczonych statynami. Świadczy to raczej o pozytywnym plejotropowym działaniu statyn na rozwój stenozy aortalnej, aniżeli o ich efekcie hipolipemizującym. Brak wpływu radykalnego leczenia hipolipemizującego na progresję stenozy aortalnej został również wykazany na większych grupach pacjentów w badaniach obserwacyjnych (Mohler, 2007 [92]) oraz randomizowanych (Rossebo, 2008 – SEAS [130]; Panahi, 2013 [109]), co ostatecznie wykluczyło stosowanie statyn w leczeniu stenozy zastawki aortalnej.

Niezadowalające efekty leków przeciwmiażdżycowych na progresję stenozy aortalnej podkreślają różnice w patofizjologii tych schorzeń, dotyczących m.in. znaczenia zaburzeń metabolizmu lipidów. Dlatego, poszukiwanie innych możliwości terapeutycznych, przede wszystkim w zakresie działania na śródbłonek zastawkowy, regulację stanu zapalnego oraz różnicowanie i proliferację fibroblastopodobnych komórek śródmiąższowych stanowi obiecującą strategię terapeutyczną. Jednym z kluczowych mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymywanie homeostazy w układzie sercowo-naczyniowym, o znaczącym potencjale terapeutycznym, jest sygnalizacja przez zewnątrzkomórkowe nukleotydy i ich katabolity, nazywana sygnalizacją purynergiczną.



RYCINA 1. Molekularne i komórkowe mechanizmy kalcyfikacji zastawki aortalnej.
W obrębie zastawki aortalnej dochodzi do uszkodzenia śródbłonka oraz wzrostu ekspresji molekuł adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1). Infiltracja komórek układu odpornościowego prowadzi do rozwoju procesu zapalnego i nacieku makrofagów. Akumulacja utlenionych lipoprotein (oxLDL) w makrofagach skutkuje powstaniem komórek piankowatych. Dochodzi do aktywacji fibroblastopodobnych komórek śródmiąższowych (VIC), czego markerem jest nabycie ekspresji alfa-aktyny mięśniówki gładkiej. Aktywacja komórek VIC jest związana ze zwiększoną produkcją i przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez wzrost ekspresji metaloproteinaz oraz wzmożoną produkcją cytokin prozapalnych. Skutkuje to rozwojem przewlekłego stanu zapalnego oraz zwłóknieniem zastawki.

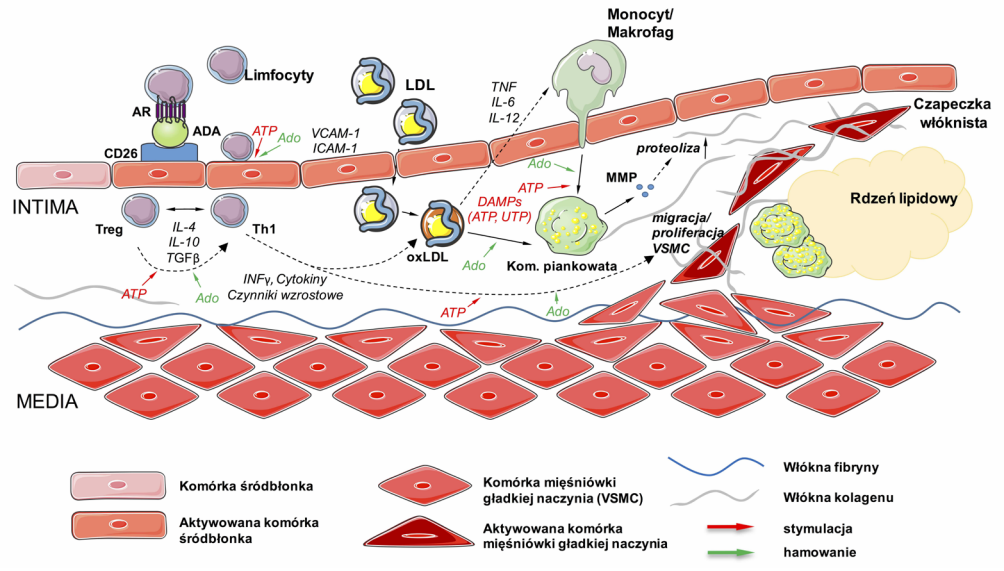
Równolegle, stymulowane komórki VIC przechodzą różnicowanie do komórek osteoblastopodobnych (obVIC), będących bezpośrednią przyczyną odkładania zwapnień. Procesy podlegające regulacji przez zewnątrzkomórkowe nukleotydy (głównie ATP) i adenozynę (Ado) zostały zaznaczone strzałkami. LDL – lipoproteiny o niskiej gęstości, VCAM-1 – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń, ICAM-1 – cząsteczka adhezji międzykomórkowej, DAMPs – wzorce molekularne związane z sygnałem niebezpieczeństwa, Ado – adenozyna, ATP – adenozynotrifosforan, UTP – urydynotrifosforan, oxLDL – utlenione LDL, TNFa – czynnik martwicy nowotworu alfa, RANKL – ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κB, IL – interleukina, TGFβ – transformujący czynnik wzrostu beta, VIC – komórki śródmiąższowe zastawki aortalnej, qVIC – wyciszone, aVIC – aktywowane VIC, obVIC – osteoblastopodobne VIC, ALP – fosfataza alkaliczna, Runx2 – czynnik transkrypcyjny Runx2

FIGURE 1. Molecular and cellular mechanisms of aortic valve calcification.

Pathological process within the aortic valve is initiated by endothelial activation and increased expression of adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1). Incoming immune cells lead to the development of local inflammatory process and macrophage infiltration. Accumulation of modified lipoproteins in macrophages results in the formation of foam cells. These factors promote activation of valvular interstitial cells (VICs) that acquire alpha-smooth muscle actin expression. The activation of VICs is associated with increased production and remodeling of extracellular matrix by metalloproteinases and increased production of inflammatory cytokines. This results in a chronic inflammatory process and fibrosis of the valve. In parallel, stimulated VICs undergo differentiation into osteoblast-like cells (obVIC), which are a direct cause of aortic valve mineralization. The processes regulated by extracellular nucleotides (mainly ATP) and adenosine (Ado) are indicated by arrows. LDL – low density lipoproteins, VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule, ICAM-1 – intercellular adhesion molecule, DAMPs – damage-associated molecular patterns, Ado – adenosine, ATP – adenosinetriphosphate, UTP – uridinetriphosphate, oxLDL – oxidized LDL, TNFa – tumor necrosis factor alfa, RANKL – receptor activator of nuclear factor κB ligand, IL – interleukina, TGFβ – transforming growth factor beta, VIC – valvular interstitial cells, qVIC – quiescent VIC, aVIC – activated VIC, obVIC – osteoblast-like VIC, ALP – alkaline phosphatase, Runx2 – transcription factor Runx2

ZNACZENIE SYGNALIZACJI PURYNERGICZNEJ W STENOZIE AORTALNEJ I MIAŻDŻYCY TĘTNIC

Obok zestawienia podobieństw i różnic w patofizjologii stenozy aortalnej i miażdżycy tętnic, nadrzędnym celem niniejszej pracy było omówienie komórkowych i molekularnych aspektów tych patologii, podlegających kontroli sygnalizacji purynergicznej. Szlaki te obejmują uwalnianie nukleotydów do przestrzeni pozakomórkowej, ich zewnątrzkomórkowy metabolizm oraz działanie przez specyficzne dla nukleotydów lub ich katabolitów receptory. Patologiczne procesy zachodzące w zastawce aortalnej oraz ścianie tętnic, wraz z udziałem w ich regulacji zewnątrzkomórkowych nukleotydów i adenozyny zostały schematycznie przedstawione na rycinie 1 (dotyczy zastawki aortalnej) i rycinie 2 (dotyczy ściany tętnicy).



RYCINA 2. Molekularne i komórkowe mechanizmy miażdżycy tętnic.
W obrębie ściany naczynia dochodzi do uszkodzenia śródbłonka, wzrostu ekspresji molekuł adhezyjnych (ICAM-1, VCAM-1) i zewnątrzkomórkowej ekto-deaminazy adenozyny. Inicjacja procesu zapalnego oraz akumulacja utlenionych lipoprotein (oxLDL) w makrofagach skutkuje powstaniem komórek piankowatych. Mediatory, takie jak nukleotydy, czynniki wzrostowe i cytokiny prozapalne stymulują komórki mięśniówki gładkiej naczyń (VSMC) do proliferacji i migracji. Ciągła akumulacja lipoprotein w komórkach piankowatych doprowadza do ich obumierania, a zawartość lipidowa gromadzi się pozakomórkowo, tworząc jądro lipidowe blaszki miażdżycowej. Przekształcone VSMC syntetyzują elementy tkanki łącznej, która pokrywając jądro lipidowe tworzy włóknisto-tłuszczową stabilną blaszkę miażdżycową. Uwalniane przez makrofagi metaloproteinazy trawią składniki tkanki łącznej co predysponuje do rozwoju niestabilnej blaszki miażdżycowej poprzez zmniejszenie grubości warstwy pokrywy włóknistej. Procesy podlegające regulacji przez zewnątrzkomórkowe nukleotydy (głównie ATP) i adenozynę (Ado) zostały zaznaczone strzałkami.
AR – receptory adenozynowe, Ado – adenozyna, ADA – deaminaza adenozyny, LDL – lipoproteiny o niskiej gęstości, VCAM-1 – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń, ICAM-1 – cząsteczka adhezji międzykomórkowej, IL – interleukina, MMP – metaloproteinazy, DAMPs – wzorce molekularne związane z sygnałem niebezpieczeństwa, ATP – adenozynotrifosforan, UTP – urydynotrifosforan, TGFβ – transformujący czynnik wzrostu beta, IFNγ – interferon gamma, TNF – czynnik martwicy nowotworu
FIGURE 2. Molecular and cellular mechanisms of atherosclerosis.
Pathological process within the vessel wall is initiated by endothelial activation and increased expression of adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) and ecto-adenosine deaminase. The initiation of inflammatory process and accumulation of modified lipoproteins in macrophages result in the formation of foam cells. The mediators, such as nucleotides, growth factors and inflammatory cytokines stimulate migration and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs). The continuous accumulation of lipoproteins in foam cells leads to their death and the formation of lipid core. Transformed VSMCs synthesize elements of extracellular matrix that covered lipid core and forms a stable fibro-fatty atherosclerotic plaque. Macrophage-derived metalloproteinases degrade extracellular matrix components which reduce the thickness of the fibrous cap and predispose to the development of an unstable,

atherosclerotic plaque. The processes regulated by extracellular nucleotides (mainly ATP) and adenosine (Ado) are indicated by arrows.
AR – adenosine receptors, Ado – adenosine, ADA – adenosine deaminase, LDL – low density lipoproteins, VCAM-1 – vascular cel adhesion molecule, ICAM-1 – intercellular adhesion molecule, IL – interleukin, MMP – metalloproteinases, DAMPs – damage-associated molecular patterns, ATP – adenosinetriphosphate, UTP – uridinetriphosphate, TGFβ – transforming growth factor beta, IFNγ – interferon gamma, TNF – tumor necrosis factor

NUKLEOTYDY JAKO CZĄSTKI SYGNAŁOWE W UKŁADZIE SERCOWO-NACZYNIOWYM

WPŁYW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH NUKLEOTYDÓW NA ROZWÓJ STENOZY AORTALNEJ I MIAŻDŻYCY TĘTNIC

Nukleotydy i ich metabolity, obecne w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, pełnią funkcje cząsteczek sygnałowych o szerokim spektrum regulowanych procesów. Szczególnie ważne są efekty ich działań w układzie sercowo-naczyniowym, poprzez regulację zapalenia, proliferacji komórek oraz kalcyfikacji tkanek miękkich. Wiele przesłanek sugeruje ich istotną rolę w kalcyfikacji zastawki aortalnej i miażdżycy tętnic [38, 58, 74]. Badania na hodowlach śródmiąższowych komórek zastawki aortalnej wykazały rolę zewnątrzkomórkowego adenozynotrifosforanu (ATP) jako bezpośredniego induktora kalcyfikacji poprzez wpływ na poziom wapnia w medium hodowlanym oraz wzrost aktywności fosfatazy alkalicznej, będącej wykładnikiem kalcyfikacji [104]. Należy również wspomnieć o istotnym znaczeniu zewnątrzkomórkowego ATP jako aktywatora: 1) procesu zapalnego poprzez stymulację przylegania i transmigracji komórek zapalnych do i w głąb endotelium, 2) utleniania LDL poprzez kontrolę produkcji ROS, 3) agregacji płytek krwi (również adenozynodifosforan, ADP) oraz 4) remodelingu kostnego, poprzez stymulację osteoklastów i wzrost ekspresji białka RANKL. Podobne efekty proaterogenne i prostenotyczne wywierają również nukleotydy pirymidynowe, m.in. urydyno tri- oraz difosforan (UTP, UDP) [139].

UWALNIANIE NUKLEOTYDÓW DO PRZESTRZENI POZAKOMÓRKOWEJ

Nukleotydy w przestrzeni komórkowej pojawiają się wskutek ich uwalniania przez wszystkie typy komórek układu sercowo-naczyniowego i krwi obwodowej. W procesie tym bierze udział szereg mechanizmów transportujących, między innymi: transport pęcherzykowy, kanały jonowe, transportery ABC oraz koneksyny i paneksyny [22]. Natomiast, stanami predysponującymi do zwiększonego uwal-

niania nukleotydów są hipoksja, hiperglikemia, aktywatory zapalenia i agregacji płytek oraz siły mechaniczne.[36]. Udział poszczególnych komórek układu sercowo-naczyniowego w uwalnianiu nukleotydów do przestrzeni międzykomórkowej został podsumowany w tabeli 1.

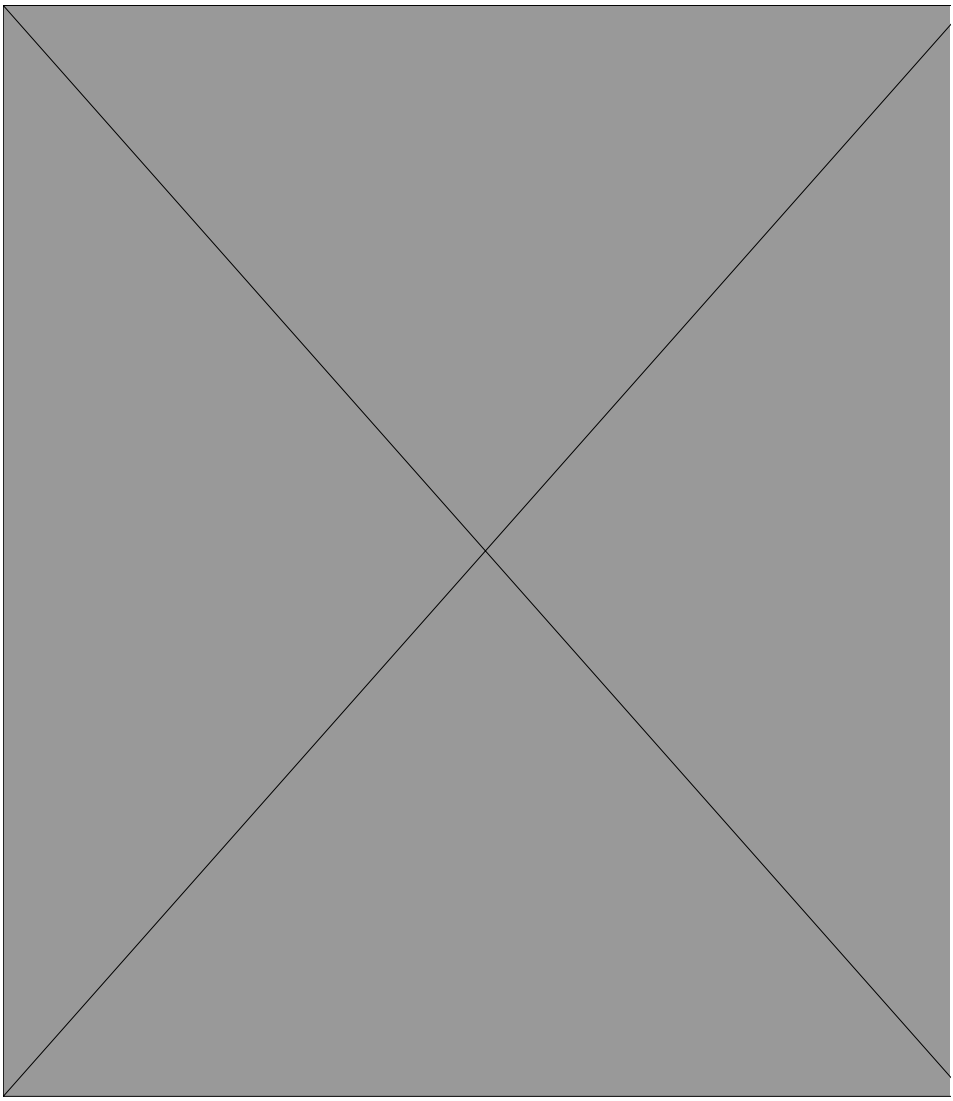
TABELA 1. Uwalnianie nukleotydów przez komórki układu sercowo-naczyniowego
ATP – adenozynotrifosforan, ADP- adenozynodifosforan, UTP – urydynotrifosforan
TABLE 1. The release of nucleotides from different cell types in the cardiovascular system
ATP – adenosinetriphosphate, ADP – adenosinediphosphate, UTP – uridinetripshosphate

Źródło komórkowe		Śródbłonek	Komórki mieśniówki gładkiej	Kardiomiocyty	Płytki krwi	Erytrocyty	Komórki układu odpornościowego
Bodziec		Naprężenie ścinające, hipoksja, hiperglikemia	Hiperglikemia, hipoksja	Hipoksja	Kolagen, tromboksan, inne aktywatory płytek	Hipoksja, adrenalina, deformacje	Aktywatory zapalenia
Uwalniane nukleotydy		ATP, UTP	ATP, UTP	ATP, UTP	ADP > ATP	ATP	ATP
Transport	pęcherzykowy	+	+		+		+
	hemikanały	+	+	+	+	+	+
	anionowy			+		+	
	transporter ABC	+	+	+	+	+	+
Referencje		[63, 78]	[79, 117]	[35, 136]	[51, 152]	[54, 73]	[9, 46]

Pomimo znacznie niższego stężenia ATP w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (nanomolowe) niż w komórce (milimolowe), nukleotydy mogą być utrzymywane nad powierzchnią komórki (w tzw. „halo komórkowym") na poziomach mikromolowych (ATP), co wraz z ich zwiększonym uwalnianiem w przebiegu szeregu stanów patologicznych, może być istotne w transdukcji sygnału i regulacji procesów leżących u podstaw patologii układu sercowo-naczyniowego [75, 158].

ZEWNĄTRZKOMÓRKOWY METABOLIZM NUKLEOTYDÓW

Uwolnione z komórek nukleotydy mogą bezpośrednio aktywować receptory purynergiczne typu P2 (ryc. 3), bądź ulec dezaktywacji przez ich zewnątrzkomórkową hydrolizę (ryc. 4). Wyniki badań naszego zespołu wykazały, że zaangażowane w ten proces enzymy, wykazują wysoką aktywność na powierzchni naczyń oraz zastawek serca [149]. Również inne źródła donoszą, że zakotwiczone w błonie komórkowej ekto-enzymy, katalizujące reakcje rozkładu zewnątrzkomórkowych nukleotydów, występują zarówno na komórkach endotelialnych, mięśniówki gładkiej, śródmiąższowych zastawki, jak i komórkach układu odpornościowego [11, 14].



RYCINA 3. Efekty aktywacji receptorów nukleotydowych i adenozynowych w procesach związanych z rozwojem stenozy aortalnej i miażdżycy tętnic.
Czerwone kwadraty przestawiają negatywne efekty aktywacji poszczególnych podtypów receptorów adenozynowych i nukleotydowych. Zielone kwadraty przedstawiają pozytywne efekty ich aktywacji. Czerwoną czcionką podkreślono negatywne efekty aktywacji receptorów adenozynowych, natomiast zieloną – pozytywne efekty aktywacji receptorów nukleotydowych. ATP – adenozynotrifosforan, ADP – adenozynotrifosforan, UTP – urydynotrifosforan, UDP – urydynodifosforan, VCAM-1 – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń, cAMP – cykliczny adenozynomonofosforan, NO – tlenek azotu, IFNγ – interferon gamma, TNF – czynnik martwicy nowotworu, MIP-1a – białko zapalne makrofagów-1 alfa, iNOS – indukowana syntaza tlenku azotu, ROS – reaktywne formy tlenu, NFκB – czynnik jądrowy NFκB, Mac-1 – integryna $\alpha_M\beta_2$, ligand dla ICAM-1, RANKL – ligand aktywatora receptora jądrowego czynnika κB, M-CSF – czynnik stymulujący powstawanie kolonii makrofagów, PTH – parathormon

FIGURE 3. The role of nucleotide and adenosine receptor activation in the pathogenesis of aortic stenosis and atherosclerosis.
Red squares indicated negative effects of specific adenosine receptor activation. While, green squares indicated positive effects of nucleotide receptor activation. ATP – adenosinetriphosphate, ADP – adenosinediphosphate, UTP – uridinetriphosphate, UDP – uridinediphosphate, VCAM-1 – vascular cel adhesion molecule, cAMP – cyclic adenosine monophosphate, NO – nitric oxide, IFNγ – interferon gamma, TNF – tumor necrosis factor, MIP-1a – Macrophage inflammatory protein 1 alpha, iNOS – inducible nitric oxide synthase, ROS – reactive oxigen species, NFκB – nuclear factor NFκB, Mac-1 – integrin $\alpha_M\beta_2$, ligand for ICAM-1, RANKL – receptor activator of nuclear factor κB ligand, M-CSF – macrophage colony- stimulating factor, PTH – parathyroid hormone

W układzie sercowo-naczyniowym pierwszym enzymem kaskady katabolizmu nukleotydów jest ekto-difosfohydrolaza trifosfonukleozydowa (eNTPD) występująca głównie jako izoforma 1 (eNTPD1, CD39), konwertująca ATP przez ADP do AMP (adenozynomonofosforan) oraz UTP (urydynotrifosforan) przez UDP (urydyno-difosforan) do UMP (urydynomonofosforan) [11] AMP i UMP są hydrolizowane przez ekto-5'nukleotydazę (e5NT, CD73).

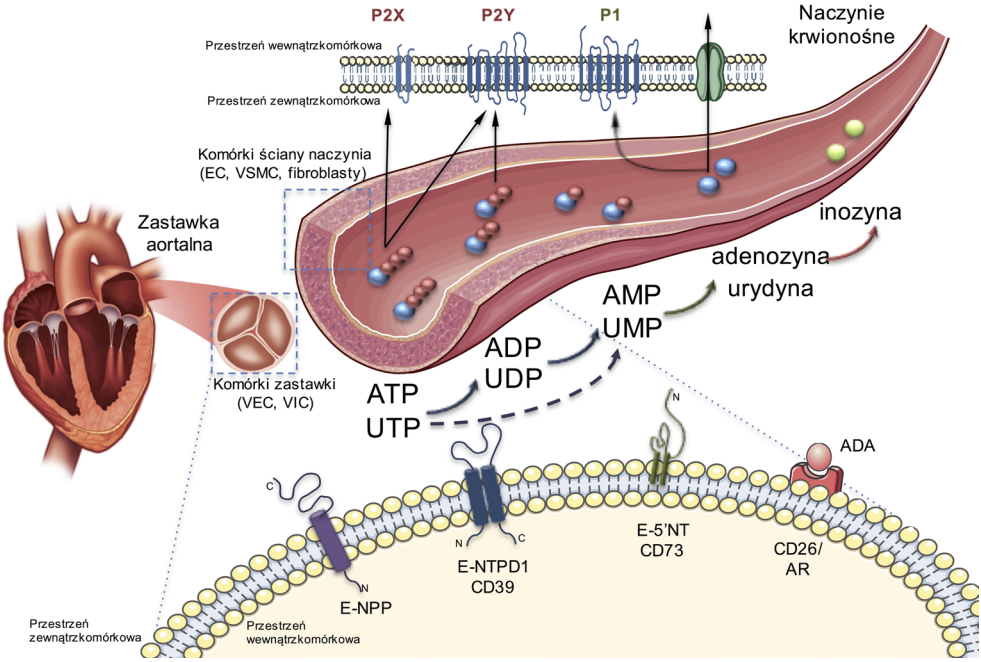
Hydroliza zewnątrzkomórkowych nukleotydów może również odbywać się alternatywną drogą, poprzez ekto-pyrofosfatazy fosfodiesterazy nukleotydowe (eNPP) oraz fosfatazę alkaliczną (ALP). Niektóre doniesienia sugerują, że aktywności tych enzymów regulują procesy ektopowego wapnienia, poprzez ich rolę w produkcji pirofosforanu (PPi), będącego inhibitorem kalcyfikacji i ortofosforanu (Pi), stymulującego ten proces [150]. W ostatnim czasie wykazano, że komórki VIC izolowane ze stenotycznych zastawek aortalnych, charakteryzują się zwiększoną aktywnością eNPP-1 i tkankowo niespecyficznej fosfatazy alkalicznej (TNAP), stymulując w ten sposób proces kalcyfikacji zastawki, poprzez produkcję Pi [32]. Zasugerowano również zwiększoną aktywność CD73 w zwapniałych zastawkach aortalnych [85].

RECEPTORY DLA NUKLEOTYDÓW

Obecność receptorów dla nukleotydów została zasygnalizowana po raz pierwszy przez brytyjskiego badacza Geoffreya Burnstocka w latach 70. ubiegłego wieku [19, 20]. Początkowo nosiły one nazwę receptorów purynergicznych. Jednak w miarę postępu badań, kiedy wykazano, że w ich aktywacji biorą udział zarówno nukleotydy purynowe jak i pirymidynowe, ich nazwa została zmieniona na „receptory nukleotydowe". Podobnie, dotychczas funkcjonuje zwyczajowa nazwa „sygnalizacji purynergicznej", jako szlaków sygnalizacyjnych, w których pośredniczą nukleotydy purynowe, pirymidynowe oraz ich katabolity.

Wyniki badań biochemicznych i farmakologicznych uzyskanych w pracowni Burnstocka wykazały dwie klasy receptorów: odpowiadających na nukleotydy

(receptory P2, receptory nukleotydowe) oraz adenozynę (receptory P1, receptory adenozynowe – opisane poniżej) [23]. Dalsze badania doprowadziły do aktualnego podziału receptorów P2, ze względu na budowę i sposób przekazywania sygnału, na dwie grupy: P2X i P2Y [21].



RYCINA 4. Schemat sygnalizacji purynergicznej w układzie sercowo-naczyniowym.
Uwolnione z komórek nukleotydy aktywują receptory P2 lub ulegają dezaktywacji poprzez zewnątrzkomórkową hydrolizę. Pierwszym enzymem kaskady katabolizmu nukleotydów jest ekto-difosfohydrolaza trifosfonukleozydowa 1 (eNTPD1, CD39), konwertująca ATP przez ADP do AMP (adenozynomonofosforan) oraz UTP (urydynotrifosforan) przez UDP (urydynodifosforan) do UMP (urydynomonofosforan). AMP i UMP są hydrolizowane przez ekto-5'nukleotydazę (e5NT, CD73), a powstała z AMP adenozyna degradowana jest przez ekto-deaminazę adenozyny (eADA). Hydroliza zewnątrzkomórkowych nukleotydów może również odbywać się alternatywną drogą poprzez ekto-pyrofosfatazy fosfodiesterazy nukleotydowe (eNPP1) oraz fosfatazę alkaliczną (ALP, nie uwzględniona na schemacie ze względu na niewielki udział w hydrolizie zewnątrzkomórkowego AMP, w stężeniach fizjologicznych).
EC – komórki śródbłonka, VSMC – komórki mięśniówki gładkiej naczyń, VEC – komórki śródbłonka zastawki, VIC – komórki śródmiąższowe zastawki, ATP – adenozynotrifisforan, ADP – adenozynodifosforan, AMP – adenozynomonofosforan, UTP – urydynotrifosforan, UDP – urydynodifosforan, UMP – urydynomonofosforan, ARs – receptory adenozynowe
FIGURE 4. Purinergic signaling in cardiovascular system.
Released nucleotides activate P2 receptors or they are inactivated by extracellular hydrolysis. Extracellular ATP and UTP are hydrolyzed through ADP and UDP to AMP and UMP by ecto-nucleoside

triphosphate diphosphohydrolase 1 (eNTPD1, CD39). AMP and UMP are hydrolyzed by ecto-5'nucleotidase (e5NT, CD73) and AMP-derived, adenosine is degraded to inosine by ecto-adenosine deaminase (eADA). Alternative pathway for extracellular nucleotide hydrolysis engages activities of ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase (eNPP) and alkaline phosphatase (ALP, not included in the figure due to low participation in extracellular AMP hydrolysis at physiological concentrations of AMP).
EC – endothelial cells, VSMC – vascular smooth muscle cells, VEC – valvular endothelial cells, VIC – valvular interstitial cells, ATP – adenosinetriphosphate, ADP – adenosinediphosphate, AMP – adenosinemonophosphate, UTP – uridinetriphosphate, UDP – uridinediphosphate, UMP – uridinemonophosphate, ARs – adenosine receptors

Receptory P2X

Receptory P2X są błonowymi kanałami jonowymi (ryc. 4) dla Na^+, K^+ i Ca^{2+} [122]. Obecnie wyróżniamy 7 podtypów receptorów P2X ($P2X_{1-7}$), które charakteryzują się homologią w granicach 30-50%. Jonotropowe receptory P2X są homo- lub heterooligomerami złożonymi zazwyczaj z trzech podjednostek. Każda podjednostka/monomer składa się z dwóch domen transbłonowych, długiej zewnątrzkomórkowej pętli łączącej domeny oraz końców C- i N- białka zlokalizowanych po stronie cytozolowej.[18]. Otwieranie kanału jonowego receptora P2X uzależnione jest od przyłączenia ligandu (ATP lub jego syntetycznych pochodnych). Jony Ca^{2+} i Na^+ napływają ze środowiska zewnętrznego do komórki, a jony K^+ wypływają z komórki zgodnie z gradientem stężeń. Na skutek przepływu tych jonów dochodzi do depolaryzacji błony, co może prowadzić do otwarcia zależnych od napięcia kanałów wapniowych, wzrostu cytozolowego stężenia Ca^{2+} i redukcji potencjału błony komórkowej [98, 99]. Wśród receptorów P2X, na szczególną uwagę zasługuje atypowy receptor $P2X_7$. Jego wyjątkową cechą jest niskie powinowactwo do ATP, wymagające milimolowych stężeń tego nukleotydu. Pozostałe receptory P2X aktywowane są przy mikromolowych stężeniach ATP. Ponadto, w warunkach przedłużonej ekspozycji komórek na milimolowe stężenia ATP, dochodzi do zmiany specyficznych dla kationów receptorów $P2X_7$ na niespecyficzne transbłonowe pory, masowo przepuszczające jony Ca^{2+} do komórki oraz większe kationy organiczne i naładowane dodatnio cząsteczki o masie do 1 kDa.[18]. W komórkach układu odpornościowego tworzone przez receptory $P2X_7$ transbłonowe pory przyczyniają się do zwiększonego uwalniania cytokin prozapalnych [113].

Receptory P2Y

Receptory P2Y są receptorami metabotropowymi związanymi z białkiem G. Obecnie wyróżniamy 8 podtypów receptorów P2Y ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$) [122]. Receptory $P2Y_1$, $P2Y_{12}$ i $P2Y_{13}$ aktywowane są głównie przez ADP, $P2Y_2$, $P2Y_4$ i $P2Y_{11}$ przez ATP i UTP, $P2Y_6$ przede wszyst-

kim przez UDP i w mniejszym stopniu przez UTP i ATP, $P2Y_{14}$ aktywowany jest przez cukrowe pochodne UDP i w mniejszym stopniu przez UDP [70]. Receptory P2Y zbudowane są z 7 domen transbłonowych (ryc. 4). Domeny połączone są sześcioma pętlami różnej wielkości (3 zewnątrzkomórkowe i 3 cytoplazmatyczne). N- koniec białka, zawierający miejsca ulegające glikozylacji, znajduje się po stronie zewnątrzkomórkowej. Natomiast C- koniec umieszczony jest po stronie cytozolowej i zawiera miejsca mogące ulegać fosforylacji. Białko G wiązane jest z receptorem po stronie wewnętrznej błony, w obrębie znajdującej się w cytoplazmie pętli trzeciej. Ligand wiązany jest przez oddziaływanie reszty fosforanowej nukleotydu z dodatnio naładowanymi resztami aminokwasów obecnymi w domenach TM3, TM6 i TM7, tworzącymi swoistą kieszeń w błonie komórkowej. Homologia między poszczególnymi receptorami P2Y wynosi od 21 do 57% [7]. W zależności od rodzaju receptora istnieją różnice w typach podjednostek białek G, sprzężonych z poszczególnymi receptorami. Stymulacja receptorów $P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_6$ i $P2Y_{11}$ (sprzężonych z podjednostką Gq) prowadzi do wzrostu aktywności fosfolipazy C i wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+}. Aktywacja receptora $P2Y_{11}$ powoduje również wzrost aktywności cyklazy adenylanowej i wzrost poziomu cAMP (poprzez podjednostkę Gs). Natomiast aktywacja receptorów $P2Y_{12-14}$ (sprzężonych z podjednostką Gi) prowadzi do spadku aktywności cyklazy adenylanowej i spadku poziomu cAMP. Efekty stymulacji poprzez aktywację receptorów P2Y nie ograniczają się jednak do przekazywania sygnału tylko przez białka G. Receptory $P2Y_{1,}$ $P2Y_{2,}$ $P2Y_6$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$ mogą również oddziaływać z kinazami Rho [34].

Wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} może być zarówno skutkiem aktywacji receptorów P2X, jak i niektórych podtypów receptorów P2Y. Główną różnicą pomiędzy nimi jest jednak szybkość działania i odpowiedzi komórki na stymulację. Aktywacja receptorów P2X osiąga szczyt po kilku milisekundach i szybko zanika. Z kolei receptory metabotropowe, z powodu uczestnictwa białek G i innych wtórnych przekaźników, działają wielokrotnie wolniej (minuty).

Komórkowa lokalizacja receptorów nukleotydowych w układzie sercowo-naczyniowym

Receptory dla nukleotydów są szeroko rozprzestrzenione w układzie sercowo-naczyniowym i występują na komórkach budujących ściany naczyń i zastawek serca oraz na komórkach i fragmentach komórek krwi obwodowej (komórki immunologiczne, płytki krwi). Rycina 3 przedstawia lokalizację komórkową poszczególnych podtypów receptorów nukleotydowych w łożysku naczyniowym oraz efekty ich aktywacji, które mogą mieć bezpośredni wpływ na rozwój miażdżycy tętnic i stenozy zastawki aortalnej, omówionych w poprzednich rozdziałach pracy.

ROLA ZEWNĄTRZKOMÓRKOWEJ ADENOZYNY

Powstała na drodze zewnątrzkomórkowej hydrolizy nukleotydów, adenozyna również uznawana jest za cząsteczkę o istotnej roli sygnalizacyjnej. Przede wszystkim, kompensuje aterogenne i prostenotyczne efekty działania nukleotydów, poprzez tłumienie zapalenia na wielu szczeblach, zmniejszenie utleniania LDL, hamowanie reaktywności płytek krwi oraz obniżanie poziomu resorpcji kości (ryc. 3) [4, 33, 102, 125]. Wykazano hamujący wpływ adenozyny na aktywność TNAP, która jak wspomniano powyżej pełni funkcję induktora kalcyfikacji, poprzez produkcję nieorganicznego fosforanu [43]. Wyniki naszych badań wykazały, że traktowanie komórek śródmiąższowych zastawki aortalnej osteogennym medium w obecności adenozyny hamowało kalcyfikację [104]. Znaczenie adenozyny jako inhibitora kalcyfikacji podkreśla również fakt, że u pacjentów z mutacją w genie kodującym ekto-5'nukleotydazę, odpowiedzialną za produkcję adenozyny, obserwuje się liczne zwapnienia w łożysku naczyniowym [140].

Jednak temat adenozyny w aspekcie patologii układu sercowo-naczyniowego nie pozostaje bez kontrowersji. Mahmut et al. [85]. sugeruje prokalcyfikacyjne działanie adenozyny, przez aktywację specyficznego podtypu receptorów adenozynowych na komórkach śródmiąższowych zastawki aortalnej.

RECEPTORY ADENOZYNOWE I ICH KOMÓRKOWA LOKALIZACJA

Komórkowe efekty działania adenozyny wywierane są przez aktywację czterech podtypów receptorów P1, czyli receptorów adenozynowych: A1, A2a, A2b i A3. Ich homologia nie przekracza 50%. Wszystkie mają jednak podobną strukturę charakterystyczną dla receptorów metabotropowych sprzężonych z białkiem G (ryc. 4). Podtypy A1 i A3 sprzężone są z podjednostką Gi i Gq, poprzez co ich aktywacja wywołuje hamowanie aktywności cyklazy adenylanowej i spadek komórkowego poziomu cAMP, jednocześnie stymulując aktywność fosfolipazy C, a w konsekwencji podnosząc komórkowe stężenie Ca^{2+}. Aktywacja podtypów A2a i A2b sprzężonych z podjednostką Gs powoduje stymulację cyklazy adenylanowej oraz wzrost poziomu cAMP [26]. Ponadto, aktywacja dominującego w sercu receptora A1, który może być również sprzężony z podjednostką Go, wykazuje bezpośrednie działanie na plazmatyczny kanał K^+. Powoduje to wypływ jonów K^+ z komórki i hiperpolaryzację błony. Uniemożliwione w ten sposób osiągnięcie potencjału błonowego, powoduje otwarcie wolnego kanału dla Ca^{2+} i w efekcie zwolnienie przewodzenia w węźle przedsionkowo-komorowym oraz hamowanie czynności węzła zatokowego [40].

Fizjologiczne stężenie adenozyny w środowisku pozakomórkowym wynosi od 30 do 200 nM i wywołuje efekty tylko na receptory o wysokim powinowactwie do adenozyny, tj. podtypy A1, A2a i A3. Do wzrostu stężenia adenozyny może dochodzić w stanach patologicznych, takich jak stan zapalny czy niedotlenienie. Aktywowany jest wówczas podtyp A2b, o znacznie niższym powinowactwie do adenozyny [40]. Należy jednak mieć na uwadze, że wzrost stężenia zewnątrzkomórkowej adenozyny w stanach patologicznych jest efektem wtórnym, będącym skutkiem uwolnienia ATP z pobudzonych komórek i jego zewnątrzkomórkowej hydrolizy przez ekto-nukleotydazy. Na skutek działania tych enzymów dochodzi do znoszenia receptorowych efektów wywoływanych przez ATP, poprzez najczęściej przeciwstawne działanie adenozyny (ryc. 3). Co więcej, na szczególne zainteresowanie zasługuje rzadko opisywana zewnątrzkomórkowa degradacja adenozyny (rycina 4). W wyniku uwarunkowanego patologiczne zaburzonego metabolizmu pozakomórkowej adenozyny dochodzi do obniżenia jej dostępności, co w konsekwencji może prowadzić do zmian w aktywacji poszczególnych podtypów receptorów adenozynowych.

ZEWNĄTRZKOMÓRKOWY METABOLIZM ADENOZYNY

Zewnątrzkomórkowa adenozyna degradowana jest przez deaminazę adenozyny (ADA), która w znacznym procencie występuje jako enzym zewnątrzkomórkowy (eADA) (ryc. 4) [157]. Aktywność eADA wykazano w komórkach śródbłonka naczyń i zastawek oraz komórkach układu immunologicznego [59, 149]. Ponadto, obok funkcji enzymatycznej, eADA może odgrywać istotną rolę jako cząsteczka adhezyjna, co wynika z faktu kotwiczenia ADA do błony komórkowej przez różne typy białek, w tym powierzchniowe białko CD26 i receptory adenozynowe (ryc. 2). Wykazano, że interakcja ADA-CD26 dostarcza kostymulacyjny sygnał limfocytom T, indukując lokalną produkcję IL-6, INF-γ i TNF-α, co stymuluje prozapalną odpowiedź Th1 [87]. Obecność ekto-deaminazy adenozyny jako białka adhezyjnego, może być szczególnie istotna na powierzchni komórek śródbłonka, w początkowym etapie rozwoju procesu patologicznego związanego z adhezją limfocytów oraz monocytów. Kolejną rolą ekto-deaminazy adenozyny, niezależną od jej funkcji enzymatycznej, jest modulowanie powinowactwa receptorów adenozynowych do ich agonistów/antagonistów. Interakcja eADA z kotwiczącymi ją w błonie komórkowej receptorami adenozynowymi wpływa na strukturalne zmiany ich konformacji, zwiększając powinowactwo i stymulując sygnalizację [27]. Rolę eADA jako dodatniego efektora allosterycznego receptorów adenozynowych potwierdzono poprzez stymulację zależnego od receptorów A1 spadku poziomu wewnątrzkomórkowego cAMP [47]. oraz indukcję szlaku MAPK i wzrostu fosforylacji ERK1/2, zależnych od aktywacji receptorów A2a [48]. Stymulacja aktywacji receptorów

adenozynowych przez eADA może mieć szczególne znaczenie w procesach przebiegających ze wzrostem jej zewnątrzkomórkowej aktywności, takich jak stan zapalny. Ponadto, ostatnie wyniki naszych badań wykazały zwiększoną aktywność naczyniowej eADA w mysim modelu miażdżycy (nokaut genu kodującego apolipoproteinę E i receptor dla LDL, ApoE-/-LDLR-/-), co związane było z odpowiedzią komórek śródbłonka na czynniki patologiczne oraz infiltracją ściany naczynia przez komórki zapalne [72]. W takim przypadku, promiażdżycowy efekt wzrostu zewnątrzkomórkowej deaminazy adenozyny może być wynikiem zarówno jej funkcji enzymatycznej, jak i nieenzymatycznej. Poprzez interakcję z receptorami o wyjściowo wysokim powinowactwie do adenozyny (A1 i A2a) zwiększona ilość białka deaminazy adenozyny w przestrzeni pozakomórkowej może dodatkowo stymulować promiażdżycowe efekty ich aktywacji [144, 153]. Podczas, gdy zależny od wzrostu aktywności eADA, spadek stężenia zewnątrzkomórkowej adenozyny może determinować zahamowanie jej protekcyjnego działania poprzez wyłączenie sygnalizacji przez receptory o niskim powinowactwie – A2b.

SYGNALIZACJA PURYNERGICZNA JAKO CEL TERAPEUTYCZNY W STENOZIE AORTALNEJ I MIAŻDŻYCY TĘTNIC

EKTO-ENZYMY SZLAKU METABOLIZMU NUKLEOTYDÓW

Ekto-enzymy szlaku metabolizmu nukleotydów odgrywają szczególną rolę w zachowaniu równowagi pomiędzy procesami stymulowanymi przez zewnątrzkomórkowe nukleotydy i adenozynę. Regulacja aktywności tych enzymów stanowi obiecujące podejście terapeutyczne w leczeniu stenozy zastawki aortalnej i miażdżycy tętnic. W tabeli 2 przedstawiono wpływ zmian aktywności ekto-enzymów katabolizmu nukleotydów i adenozyny na progresję schorzeń układu sercowo-naczyniowego, z zastosowaniem zwierzęcych modeli eksperymentalnych: myszy typu *knock-out* (nie posiadających genów kodujących poszczególne ekto-enzymy) i myszy z nadekspresją poszczególnych białek enzymatycznych. Z kolei, w tabeli 3 zestawiono efekty działania farmakologicznych inhibitorów i aktywatorów ekto-enzymów metabolizmu nukleotydów. Zebrane dane podkreślają potencjał stymulacji aktywności eNTPD1 w terapii przeciwpłytkowej oraz e5'NT w regulacji funkcji śródbłonka, hamowaniu zapalenia, rozwoju blaszki miażdżycowej oraz wapnienia. Ponadto, zastosowanie terapeutyczne w mineralizacji tkanek miękkich mogą odnaleźć regulatory aktywności TNAP oraz eNPP1. Warty zainteresowania jest również protekcyjny wpływ hamowania aktywności ekto-deaminazy adenozyny na stan śródbłonka naczyniowego oraz rozwój lokalnego

procesu zapalnego. Stawia to w nowym świetle potencjał niskich dawek farmakologicznych inhibitorów deaminazy adenozyny, stosowanych obecnie w praktyce klinicznej oraz innych związków, w tym pochodzenia naturalnego o właściwościach hamujących eADA (np. flawonoidów).

TABELA 2. Wpływ zmian aktywności ekto-enzymów metabolizmu nukleotydów i adenozyny na rozwój patologii sercowo-naczyniowych w mysich modelach eksperymentalnych.
eNTPD1 (CD39) – ekto-difosfohydrolaza trifosfonukleozydowa 1, *h*CD39 – transgeniczne myszy z nadekspresją ludzkiej CD39, eNPP1- ekto-pyrofosfataza/fosfodiesteraza nukleotydowa 1, eNPP1 Tg – transgeniczne myszy z nadekspresją eNPP1, TNAP – tkankowo niespecyficzna fosfataza alkaliczna, e5'NT (CD73) – ekto-5'nukleotydaza, *h*CD73 Tg – transgeniczne myszy z obniżoną odpornością po przeszczepie komórek macierzystych pochodzących od pacjentów z mutacją w genie kodującym e5'NT, eADA – ekto-deaminaza adenozyny, scid/scid – myszy z ciężkim złożonym niedoborem odporności, będącym wynikiem mutacji w genie kodującym deaminazę adenozyny
TABLE 2. The role of nucleotide and adenosine metabolism ecto-enzymes in the development of vascular pathologies in experimental animal models.
eNTPD1 (CD39) – ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, *h*CD39 – transgenic mice with the overexpression of human CD39, eNPP1 – ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1, eNPP1 Tg – transgenic mice with the overexpression of eNPP1, TNAP – tissue nonspecific alkaline phosphatase, e5'NT (CD73) – ecto-5'-nucleotidase, *h*CD73 Tg – immunocompromised transgenic mice after transplantation of stem cells from patients with arterial calcific disease due to deficiency of CD73, eADA – ecto-adenosine deaminase, scid/scid – mice with severe combine immunodeficiency syndrome, due to the mutation in adenosine deaminase gene

Cel terapeutyczny	Model	Wpływ na aktywność enzymatyczną	Efekt działania
eNTPD1 (CD39)	CD39+/-/ApoE-/-	↓	Pro-miażdżycowy [66]
	CD39-/-/ApoE-/-	↓↓	Pro-zakrzepowy, Pro-miażdżycowy (zwiększony wychwyt lipoptotein przez makrofagi) [65]
	*h*CD39 Tg	↑	Przeciw-zakrzepowy [55]
eNPP1	eNPP1+/- eNPP1-/-	↓ ↓↓	Hamowanie przerostu neointimy [134]
	eNPP1-/-	↓	Wapnienie naczyń [25][80]
	eNPP1-/-ApoE-/-	↓	Przeciw-miażdżycowy [96]
	eNPP1 Tg	↑	Insulinooporność, hiperglikemia [83]
			Zespół metaboliczny [108]
TNAP	TNAP-OE	↑	Wapnienie naczyń [135]
e5'NT (CD73)	CD73-/-ApoE-/-	↓	Pro-miażdżycowy [17]
	CD73-/-		Pro-zakrzepowy [68] Pro-zapalny [68] [151] Stenoza zastawki aortalnej [165]
	*h*CD73-/- Tg		Wapnienie naczyń [52]
eADA/ADA1	*scid/scid*/ApoE-/-	↓	Przeciw-miażdżycowy [163]
	ADA-/-		Przeciw-zapalny [112]

TABELA 3. Możliwości farmakologicznej regulacji aktywności ekto-enzymów metabolizmu nukleotydów i adenozyny w terapii chorób sercowo-naczyniowych.
eNTPD1 – ekto-difosfohydrolaza trifosfonukleozydowa 1, rozp. eNTPD1 – rozpuszczalna eNTPD1, eNPP1- ekto-pyrofosfataza/fosfodiesteraza nukleotydowa 1, eNPP1-Fc – białko fuzyjne ludzkiej eNPP1 z domeną Fc IgG1, TNAP – tkankowo niespecyficzna fosfataza alkaliczna, e5'NT – ekto-5'nukleotydaza, rozp. e5'NT – rozpuszczalna e5'NT, eADA – ekto-deaminaza adenozyny, EHNA – *erytro*-9-(2-*hydroksy*-3-*nonyl*)*adenina*

TABELA 3. Therapeutic potential of the regulation of nucleotide and adenosine metabolism ecto-enzymes in vascular pathologies.
eNTPD1 – ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, rozp. eNTPD1 – soluble eNTPD1, eNPP1 – ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1, eNPP1-Fc – fiusion protein of human eNPP1 with Fc IgG1 domain, TNAP – tissue nonspecific alkaline phosphatase, e5'NT – ecto-5'nucleotidase, rozp. e5'NT – soluble e5'NT, eADA – ecto-adenosine deaminase, EHNA – *erythro*-9-(2-*hydroxy*-3-*nonyl*)*adenine*

Cel terapeutyczny	Badany związek	Wpływ na aktywność enzymatyczną	Efekt działania
eNTPD1	Rozp. eNTPD1	↑	Hamowanie reaktywności płytek krwi [42]
eNTPD1-3	ARL67156	↓	Hamowanie wapnienia aorty/zastawki aortalnej [28]
eNPP1			
eNPP1	eNPP1-Fc	↑	Hamowanie wapnienia naczyń [1]
TNAP	Lewamizol	↓	Hamowanie wapnienia komórek mięśniówki gładkiej naczyń [82]
	Etidronat		
e5'NT	Rozp. e5'NT	↑	Uszczelnienie bariery śródbłonka [148]
	Sulfasalazyna		Przeciw-zapalny [8]
	Metotreksat		Przeciw-zapalny [95] Przeciw-miażdżycowy [124]
	Atorwastatyna	↑ [103]	Przeciw-miażdżycowy [159] Hamowanie wapnienia komórek śródmiąższowych zastawki aortalnej [105]
eADA	Atorwastatyna	↓ [72]	Przeciw-miażdżycowy [159]
	2'deoksykoformycyna	↓	Przeciw-zapalny, przeciw-miażdżycowy protekcyjny względem śródbłonka [72]
	EHNA	↓	Przeciw-zapalny [5]
	Kemferol	↓ [72], [91]	Przeciw-miażdżycowy [67]

RECEPTORY NUKLEOTYDOWE I ADENOZYNOWE

Kolejnym celem terapeutycznym w leczeniu stenozy zastawki aortalnej oraz miażdżycy tętnic jest regulacja sygnalizacji purynergicznej poprzez specyficzne receptory. Warto również w tym aspekcie zaznaczyć rolę ekto-enzymów meta-

bolizmu nukleotydów i adenozyny, które regulując zewnątrzkomórkowe stężenie poszczególnych agonistów receptorów purynergicznych, modyfikują ich preferencyjną aktywację. Ma to szczególne znaczenie dla aktywacji receptorów adenozynowych stymulowanych przez niskie (A1, A2a i A3) oraz wysokie (A2b) stężenia adenozyny, regulowane przez aktywności e5'NT i eADA. Obniżenie aktywności eADA w mysim modelu miażdżycy oraz włączenie sygnalizacji przez receptory A2b, może być jednym z kluczowych mechanizmów przeciwmiażdżycowego działania dCF [72]. Wyniki badań eksperymentalnych dotyczących działania agonistów i antagonistów poszczególnych receptorów adenozynowych przedstawiono w tabeli 4.

TABELA 4. Wpływ aktywacji i hamowania receptorów adenozynowych oraz terapeutyczne możliwości ich regulacji w miażdżycy tętnic i stenozie zastawki aortalnej (kalcyfikacji tkanek miękkich).
HIF-1α – czynnik indukowany hipoksją 1, b.w. – bez wpływu, VSMC – komórki mięśniówki gładkiej naczyń, białko ABCA1 – transporter A1 kompleksu błonowego ATP zaangażowany w eksport cholesterolu na zewnątrz komórki, VEGF – czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego, siA1R; siA2aR – wyciszenie ekspresji genów dla receptorów adenozynowych A1 i A2a
TABLE 4. The role of adenosine receptors activation/inhibition and therapeutic potential of their regulation in atherosclerosis and aortic stenosis.
HIF-1α – hypoxia-inducible factor 1-alpha, b.w. – no effect, VSMC – vascular smooth muscle cells, ABCA1 protein – ATP-binding cassette transporter ABCA1, VEGF – vascular endothelial growth factor, siA1R; siA2aR – silencing gene expression for A1 and A2a adenosine receptors

Receptor P1	Związek chemiczny/ model	Wpływ na receptor	Efekt działania
A1	CHA	(+)	Indukcja HIF1α
	CPPA		Indukcja HIF1α
		(+)	Przeciw-zapalny [37] Uszczelnienie bariery śródbłonka [137] Brak wpływu na resorpcję kości [89]
	DPCPX	(-)	Przeciw-miażdżycowy [144] Hamowanie aktywacji śródbłonka [161] Hamowanie resorpcji kości (inhibicja proliferacji osteoklastów) [89]
	siA1R	(-)	Mineralizacja komórek śródmiąższowych zastawki aortalnej [85]
	A1-/-ApoE-/- na diecie wysokotłuszczowej	(-)	Przeciw-miażdżycowy (pomimo wzrostu stężenia triacelogliceroli w surowicy), Przeciw-zapalny (spadek stężenia IL-12, IL-5, IL-6, MCP-1), Hamowanie proliferacji komórek [145]

A2a	CGS-21680	(+)	Stymulacja transportu zwrotnego z makrofagów (wzrost aktywności 27α-hydroksylazy sterolowej oraz ekspresji ABCA1) [126][125] Hamowanie proliferacji i migracji VSMC [31]
	ATL-146	(+)	Przeciw-zapalny (spadek akumulacji neutrofili) [111]
	CGS21680	(+)	Hamowanie resorpcji kości (poprzez inhibicję różnicowania i proliferacji osteoklastów) [89]
	CV1808/	(+)	Mineralizacja komórek śródmiąższowych zastawki aortalnej (szlak MAPK) [85]
	BF066	(+)	Hamowanie agregacji płytek krwi [107]
	ZM241385	(-)	Stymuluje aktywność metaloproteinaz [146]
	siA2aR	(-)	Hamowanie mineralizacji komórek śródmiąższowych zastawki aortalnej (szlak MAPK) [85]
	A2a-/-ApoE-/-	(-)	Przeciw-miażdżycowy (redukcja blaszki miażdżycowej, pomimo wzrostu stężenia cytokin prozapalnych i cholesterolu w surowicy) [154]
A2b	BAY 60-6053	(+)	Przeciw-miażdżycowy, hipolipemizujący (wpływ na ekspresję SREBP-1 poprzez zmiany w wewnątrzkomórkowym poziomie cAMP) [69] Stabilizacja blaszki miażdżycowej (poprzez wzrost zawartości kolagenu) [15] Hamowanie resorpcji kości (poprzez inhibicję białka RANKL) [89]
	NECA CGS-21680	(+) (b.w.)	Rozkurcz naczyń (zależny od śródbłonka) [101]
	Związek 24	(+)	Indukcja HIF1α (wpływ na fosforylację pERK1/2 i pAkt) [45]
	PSB603	(-)	Zniesienie proliferacji osteoblastów [89]
	A2b-/-	(-)	Wzrost stężenia cholesterolu i triacelogliceroli w surowicy [29]
	A2b-/- na diecie wysokotłuszczowej	(-)	Pro-miażdżycowy [61]
	A2b-/-ApoE-/-	(-)	Pro-miażdżycowy [69]
A3	CI-IB-MECA	(+)	Indukcja HIF1α (wpływ na fosforylację pERK1/2) [45]
	IB-MECA	(+)	Przeciw-zapalny (inhibicja NF-Kβ) [127] Hamowanie aktywacji makrofagów (spadek produkcji białka zapalnego makrofagów MIP-1α) [143] Hamowanie resorpcji kości (poprzez spadek ilości osteoklastów) [89]
	MRE 3008F20	(-)	Hamowanie HIF1α, produkcji VEGF, tworzenia komórek piankowatych [45]
	A3-/-ApoE-/-	(-)	Bez wpływu na rozwój miażdżycy [62]

TABELA 5. Możliwości terapeutycznego hamowania receptorów nukleotydowych w miażdżycy tętnic i stenozie zastawki aortalnej
TABLE 5. Therapeutic potential of the inhibition of nucleotide receptors in atherosclerosis and aortic stenosis

Receptor P2	Związek chemiczny	Wpływ na receptor	Efekt działania
P2X1	NF449	(-)	Hamowanie agregacji płytek krwi (szybka odpowiedź: wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} w kilka milisekund) [84]
P2X2/3 P2X3	AF-353	(-)	Przeciw-nadciśnieniowy (normalizacja pobudzenia kłębka szyjnego) [115]
P2X4	PSB-12253	(-)	Protekcyjny względem śródbłonka (spadek ekspresji molekuł adhezyjnych, hamowanie odpowiedzi zapalnej) [133]
P2X7	AZ11645373 ADZ9056	(-) (-)	Protekcyjny względem śródbłonka (spadek ekspresji molekuł adhezyjnych, hamowanie odpowiedzi zapalnej) [133] Przeciw-zapalny [6]
P2Y1	MRS2179	(-)	Hamowanie agregacji płytek (poprzez wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+}) [22] Rozkurcz naczyń (zależny od śródbłonka) [64]
P2Y2	AR-C 126313	(-)	Przeciw-zapalny [38, 90]
P2Y4	MRS2577	(-)	Przeciw-zapalny (zmniejszona infiltracja neutrofili), Hamujący aktywność metaloproteinaz (przez wpływ na endotelinę-1) [38, 53]
P2Y6	MRS2578	(-)	Przeciw-zapalny (hamowanie zapalenia w ścianie naczynia poprzez inhibicję NF-Kβ, produkcji IL-8, Protekcyjny względem śródbłonka (spadek ekspresji molekuł adhezyjnych [12, 38]
P2Y11	NF157	(-)	Przeciw-zapalny (hamowanie proliferacji makrofagów M1 oraz produkcji IL-6) [131]
P2Y12	Klopidogrel Kanglerol Tikagrelor	(-)	Hamowanie agregacji płytek [3]
P2Y12/13	Kanglerol (AR-C69931MX)	(-)	Hamowanie agregacji płytek [3] Aktywacja endocytozy cząsteczek HDL przez hepatocyty [57]
P2Y14	PPTN	(-)	Przeciw-zapalny [10]

Kolejna możliwość terapii schorzeń układu sercowo-naczyniowego, dotyczy regulacji (przede wszystkim hamowania) receptorów nukleotydowych. Zestawienie wpływu antagonistów receptorów P2 na procesy predysponujące do rozwo-

ju stenozy aortalnej oraz miażdżycy tętnic obrazuje tabela 5. Szczególny sukces w praktyce klinicznej odnoszą obecnie antagoniści receptora P2Y12, hamujący zależną od ADP agregację płytek krwi. Jednym z nich jest klopidogrel, którego podawanie wraz z niskimi dawkami kwasu acetylosalicylowego jest złotym standardem u chorych z niestabilną dławicą piersiową oraz zawałem bez uniesienia odcinka ST. [160]. Ponadto, w roku 2011 w Stanach Zjednoczonych dopuszczony został tikagrelor, inhibitor receptora P2Y12, metabolizowany przez CYP3A4 (klopidogrel metabolizowany jest przez CYP450). Ponadto, inny inhibitor receptora P2Y12, hamujący również receptor P2Y13 – kanglerol (będący prolekiem, wymagającym metabolizmu do formy aktywnej) jest obecnie testowany w 3 fazie badań klinicznych [3]. Oprócz działania anty-agregacyjnego, wykazano również wpływ kanglerolu na endocytozę lipoprotein HDL przez komórki wątrobowe, co może nieść za sobą istotne działanie przeciwmiażdżycowe [57]. Antagoniści pozostałych receptorów nukleotydowych wykazują ponadto działanie przeciwnadciśnieniowe (P2X2/3), przeciwzapalne (P2X4/7, P2Y2/4/6/11/14) oraz protekcyjne względem śródbłonka (P2X4/7, P2Y6). Dodatkowo, podobnie jak w przypadku receptorów P2Y12 i 13, hamowanie P2X1 i P2Y1 również wywołuje efekty anty-agregacyjne. Nie jest to jednak związane z wpływem na wewnątrzkomórkowy poziom cyklicznego AMP (jak w przypadku receptorów P2Y12/13), a z regulacją stężenia jonów wapnia, koniecznych do aktywacji niektórych czynników krzepnięcia. W tym aspekcie należy zaznaczyć różnice w czasie odpowiedzi na aktywację/hamowanie poszczególnych podtypów receptorów P2, wynikających z ich budowy. Zamknięcie kanału jonowego receptora P2X1, skutkuje znacznie szybszą reakcją na jego hamowanie, niż modyfikacja receptora P2Y1 i zahamowanie zależnej od wiązania nukleotydu kaskady wtórnych przekaźników (w tym fosfolipazy C). Zatem, jednoczesne hamowanie receptorów P2Y1 i P2X1 stanowi obiecujące podejście terapeutyczne polegające na szybszym i silniejszym działaniu anty-agregacyjnym poprzez zależną i niezależną od cyklicznego AMP, regulację wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} [84].

WNIOSKI

Ścieżki sygnalizacji purynergicznej pełnią istotną rolę w regulacji wielu procesów leżących u podstaw stenozy aortalnej i miażdżycy tętnic. Jednak temat ten wciąż budzi wiele kontrowersji. Badania nad enzymami degradującymi zewnątrzkomórkowe nukleotydy i adenozynę oraz nad specyficznymi receptorami purynergicznymi mogą prowadzić do wdrożenia nowoczesnych terapii i monitorowania schorzeń układu sercowo-naczyniowego.

PODZIĘKOWANIA

Dziękuję pracownikom Katedry i Zakładu Biochemii, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, za owocne dyskusje na temat sygnalizacji purynergicznej, które były motywujące w pisaniu niniejszej pracy.

Praca finansowana w ramach zadania badawczego dla młodych naukowców nr 01-0241/08/256 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

LITERATURA

[1] Albright, R.A, Stabach, P., Cao, W., Kavanagh, D., Mullen, I., Braddock, A.A., et al.: ENPP-1-Fc prevents mortality and vascular calcifications in rodent model of generalized arterial calcification of infancy. *Nat Commun* 2015; **6**: 10006.

[2] Almuti, K., Rimawi, R., Spevack, D., Ostfeld, R.J.: Effects of statins beyond lipid lowering: Potential for clinical benefits. *Int J Cardiol* 2006; **109**: 7-15.

[3] Angiolillo, D.J., Schneider, D.J., Bhatt, D.L., French, W.J., Price, M.J., Saucedo, J.F., et al.: Pharmacodynamic effects of cangrelor and clopidogrel: the platelet function substudy from the cangrelor versus standard therapy to achieve optimal management of platelet inhibition (CHAMPION) trials. *J Thromb Thrombolysis* 2012; **34**: 44-55.

[4] Antonioli, L., Csoka, B., Fornai, M., Colucci, R., Kokai, E., Blandizzi, C., et al.: Adenosine and inflammation: what's new on the horizon? *Drug Discov Today* 2014; **19**: 1051-1068.

[5] Antonioli, L., Fornai, M., Colucci, R., Ghisu, N., Da Settimo, F., Natale, G., et al.: Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; **322**: 435-442.

[6] Arulkumaran, N., Unwin, R.J., Tam, F.W.: A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. *Expert Opin Investig Drugs* 2011; **20**: 897-915.

[7] Barańska, J.: Receptory nukleotydowe — budowa i funkcje, historia i perspektywy. *Postepy Biochem* 2014; **60**: 424-437.

[8] Barletta, K.E., Ley, K., Mehrad, B.: Regulation of Neutrophil Function by Adenosine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; **32**:.

[9] Baroja-Mazo, A., Barberà-Cremades, M., Pelegrín, P.: The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochim Biophys Acta – Biomembr* 2013; **1828**: 79-93.

[10] Barrett, M.O., Sesma, J.I., Ball, C.B., Jayasekara, P.S., Jacobson, K.A., Lazarowski, E.R., et al.: A Selective High-Affinity Antagonist of the P2Y14 Receptor Inhibits UDP-Glucose-Stimulated Chemotaxis of Human Neutrophils. *Mol Pharmacol* 2013; **84**: 41-49.

[11] Behdad, A., Sun, X., Khalpey, Z., Enjyoji, K., Wink, M., Wu, Y., et al.: Vascular smooth muscle cell expression of ectonucleotidase CD39 (ENTPD1) is required for neointimal formation in mice. *Purinergic Signal* 2009; **5**: 335-342.

[12] Blackburn, M.R., Gao, X., Airhart, M.J., Skalko, R.G., Thompson, L.F., Knudsen, T.B.: Adenosine levels in the postimplantation mouse uterus: quantitation by HPLC-fluorometric detection and spatiotemporal regulation by 5'-nucleotidase and adenosine deaminase. *Dev Dyn* 1992; **194**: 155-168.

[13] Bogdański, P., Pupek-Musialik, D.: Statyny – standard terapii XXI wieku. Jak wybrać optymalną dawkę? *Forum Zaburzeń Metab* 2010; **1**: 131-140.

[14] Bonner, F., Borg, N., Burghoff, S., Schrader, J.: Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes CD39 and CD73 after ischemic injury. *PLoS One* 2012; **7**: e34730.
[15] Bot, I., de Vries, H., Korporaal, S.J., Foks, A.C., Bot, M., van Veldhoven, J., et al.: Adenosine A(2)B receptor agonism inhibits neointimal lesion development after arterial injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Arter Thromb Vasc Biol* 2012; **32**: 2197-2205.
[16] Briand, M., Lemieux, I., Dumesnil, J.G., Mathieu, P., Cartier, A., Després, J.-P., et al.: Metabolic Syndrome Negatively Influences Disease Progression and Prognosis in Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2006; **47**: 2229-2236.
[17] Buchheiser, A., Ebner, A., Burghoff, S., Ding, Z., Romio, M., Viethen, C., et al.: Inactivation of CD73 promotes atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res* 2011; **92**: 338-347.
[18] Burnstock, G.: Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**: 1471-1483.
[19] Burnstock, G.: Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 1972; **24**: 509-81.
[20] Burnstock, G.: Purinergic receptors. *J Theor Biol* 1976; **62**: 491-503.
[21] Burnstock, G., Kennedy, C.: Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 1985; **16**: 433-40.
[22] Burnstock, G., Ralevic, V.: Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol Rev* 2014; **66**: 102-192.
[23] Burnstock G: A basis for distinguishing two types of purynergic receptor, W: Straub RW, Boils L (red), Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach. *Raven Press New York* 1978; 107-118.
[24] Butcher, J.T., Nerem, R.M.: Valvular endothelial cells and the mechanoregulation of valvular pathology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007; **362**: 1445-57.
[25] Cecil, D.L., Terkeltaub, R.A.: Arterial calcification is driven by RAGE in Enpp1-/- mice. *J Vasc Res* 2011; **48**: 227-35.
[26] Chen, J.F., Eltzschig, H.K., Fredholm, B.B.: Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov* 2013; **12**: 265-286.
[27] Cortés, A., Gracia, E., Moreno, E., Mallol, J., Lluís, C., Canela, E.I., et al.: Moonlighting Adenosine Deaminase: A Target Protein for Drug Development. *Med Res Rev* 2015; **35**: 85-125.
[28] Côté, N., El Husseini, D., Pépin, A., Guauque-Olarte, S., Ducharme, V., Bouchard-Cannon, P., et al.: ATP acts as a survival signal and prevents the mineralization of aortic valve. *J Mol Cell Cardiol* 2012; **52**: 1191-1202.
[29] Csoka, B., Koscso, B., Toro, G., Kokai, E., Virag, L., Nemeth, Z.H., et al.: A2B Adenosine Receptors Prevent Insulin Resistance by Inhibiting Adipose Tissue Inflammation via Maintaining Alternative Macrophage Activation. *Diabetes* 2014; **63**: 850-866.
[30] Davies, P.F., Remuzzitt, A., Gordon, E.J., Dewey, C.F., Gimbrone, M.A.: Turbulent fluid shear stress induces vascular endothelial cell turnover in vitro (hemodynamic forces/endothelial growth control/atherosclerosis). *Cell Biol* 1986; **83**: 2114-2117.
[31] Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Mi, Z., Jackson, E.K.: Adenosine inhibits growth of human aortic smooth muscle cells via A2B receptors. *Hypertension* 1998; **31**: 516-521.
[32] El-Hamamsy, I., Balachandran, K., Yacoub, M.H., Stevens, L.M., Sarathchandra, P., Taylor, P.M., et al.: Endothelium-dependent regulation of the mechanical properties of aortic valve cusps. *J Am Coll Cardiol* 2009; **53**: 1448-55.
[33] Eltzschig, H.K.: Adenosine: an old drug newly discovered. *Anesthesiology* 2009; **111**: 904-915.
[34] Erb, L., Weisman, G.A.: Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 2012; **1**: 789-803.
[35] Erdei, Z., Lőrincz, R., Szebényi, K., Péntek, A., Varga, N., Likó, I., et al.: Expression pattern of the human ABC transporters in pluripotent embryonic stem cells and in their derivatives. *Cytometry B Clin Cytom* 2014; **86**: 299-310.

[36] Erlinge, D., Burnstock, G.: P2 receptors in cardiovascular regulation and disease. *Purinergic Signal* 2008; **4**: 1-20.
[37] Fernandez, L.G., Sharma, A.K., LaPar, D.J., Kron, I.L., Laubach, V.E.: Adenosine A1 receptor activation attenuates lung ischemia–reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013; **145**: 1654-1659.
[38] Ferrari, D., Vitiello, L., Idzko, M., la Sala, A.: Purinergic signaling in atherosclerosis, (2015).
[39] Fic, P., Zakrocka, I., Kurzepa, J., Stepulak, A.: Metaloproteinazy w miażdżycy naczyń krwionośnych. *Postepy Hig Med Dosw* 2011; **65**: 16-27.
[40] Fredholm, B.B.: Adenosine receptors as drug targets. *Exp Cell Res* 2010; **316**: 1284-1288.
[41] Freeman, R. V, Otto, C.M.: Spectrum of calcific aortic valve disease pathogenesis, disease progression, and treatment strategies. *Circulation* 2005; **111**: 3316-3326.
[42] Fung, C.Y.E., Marcus, A.J., Broekman, M.J., Mahaut-Smith, M.P.: P2X1 Receptor Inhibition and Soluble CD39 Administration as Novel Approaches to Widen the Cardiovascular Therapeutic Window. *Trends Cardiovasc Med* 2009; **19**: 1-5.
[43] Gan, X.T., Taniai, S., Zhao, G., Huang, C.X., Velenosi, T.J., Xue, J., et al.: CD73-TNAP crosstalk regulates the hypertrophic response and cardiomyocyte calcification due to alpha1 adrenoceptor activation. *Mol Cell Biochem* 2014; **394**: 237-246.
[44] Gąsior, Z., Stępińska, J., Podolec, P., Ablewska, U.: Postępy w diagnostyce i leczeniu nabytych zastawkowych wad serca. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego 2011.
[45] Gessi, S., Fogli, E., Sacchetto, V., Merighi, S., Varani, K., Preti, D., et al.: Adenosine Modulates HIF-1α, VEGF, IL-8, and Foam Cell Formation in a Human Model of Hypoxic Foam Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; **30**:.
[46] Giraud, C., Manceau, S., Treluyer, J.-M.: ABC transporters in human lymphocytes: expression, activity and role, modulating factors and consequences for antiretroviral therapies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010; **6**: 571-89.
[47] Gracia, E., Cortés, A., Meana, J.J., García-Sevilla, J., Herhsfield, M.S., Canela, E.I., et al.: Human adenosine deaminase as an allosteric modulator of human A_1 adenosine receptor: abolishment of negative cooperativity for [^{3} H].(R)-pia binding to the caudate nucleus. *J Neurochem* 2008; **107**: 161-170.
[48] Gracia, E., Pérez-Capote, K., Moreno, E., Barkešová, J., Mallol, J., Lluís, C., et al.: A_{2A} adenosine receptor ligand binding and signalling is allosterically modulated by adenosine deaminase. *Biochem J* 2011; **435**: 701-709.
[49] Hansson, G.K., Hermansson, A.: The immune system in atherosclerosis. In: Nat Immunol. pp. 204-212 , United States (2011).
[50] Helske, S., Kupari, M., Lindstedt, K.A., Kovanen, P.T.: Aortic valve stenosis: an active atheroinflammatory process. *Curr Opin Lipidol* 2007; **18**: 483-491.
[51] Hiasa, M., Togawa, N., Miyaji, T., Omote, H., Yamamoto, A., Moriyama, Y.: Essential role of vesicular nucleotide transporter in vesicular storage and release of nucleotides in platelets. *Physiol Rep* 2014; **2**:.
[52] St. Hilaire, C., Jin, H., Yuting, H., Yu, Z., Yang, D., Negro, A., et al.: In vivio disease modeling patient-derived iPSCs: CD73-deficency promotes osteogenic differentiation and calcification. In: Purinergic signalling January 24-28 2016. p. 72 (2016).
[53] Horckmans, M., Esfahani, H., Beauloye, C., Clouet, S., di Pietrantonio, L., Robaye, B., et al.: Loss of Mouse $P2Y_4$ Nucleotide Receptor Protects against Myocardial Infarction through Endothelin-1 Downregulation. *J Immunol* 2015; **194**: 1874-1881.
[54] Huang, Y.-J., Maruyama, Y., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N., Roper, S.D.: The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 6436-41.

[55] Huttinger, Z.M., Milks, M.W., Nickoli, M.S., Aurand, W.L., Long, L.C., Wheeler, D.G., et al.: Ectonucleotide Triphosphate Diphosphohydrolase-1 (CD39) Mediates Resistance to Occlusive Arterial Thrombus Formation after Vascular Injury in Mice. *Am J Pathol* 2012; **181**: 322-333.

[56] Iung, B., Baron, G., Butchart, E.G., Delahaye, F., Gohlke-Bärwolf, C., Levang, O.W., et al.: A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J* 2003; **24**: 1231-43.

[57] Jacquet, S., Malaval, C., Martinez, L.O., Sak, K., Rolland, C., Perez, C., et al.: Cellular and Molecular Life Sciences The nucleotide receptor P2Y 13 is a key regulator of hepatic High-Density Lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell Mol Life Sci* 2005; **6205**: 2508-2515.

[58] Jalkanen, J., Yegutkin, G.G., Hollmen, M., Aalto, K., Kiviniemi, T.O., Salomaa, V., et al.: Aberrant Circulating Levels of Purinergic Signaling Markers are Associated with Several Key Aspects of Peripheral Atherosclerosis and Thrombosis. *Circ Res* 2015; **116**: 1206-15.

[59] J Szentmiklosi, A., Cseppento, A., Harmati, G., P Nanasi, P.: Novel trends in the treatment of cardiovascular disorders: site-and event-selective adenosinergic drugs. *Curr Med Chem* 2011; **18**: 1164-1187.

[60] Jawien Jacek: Nowe, immunologiczne spojrzenie na patogenezę miażdżycy. *Pol Arch Med Wewnętrznej* 2008; **118**: 127-131.

[61] Johnston-Cox, H., Koupenova, M., Yang, D., Corkey, B., Gokce, N., Farb, M.G., et al.: The A2b Adenosine Receptor Modulates Glucose Homeostasis and Obesity. *PLoS One* 2012; **7**: e40584.

[62] Jones, M.R., Zhao, Z., Sullivan, C.P., Schreiber, B.M., Stone, P.J., Toselli, P.A., et al.: A3 adenosine receptor deficiency does not influence atherogenesis. *J Cell Biochem* 2004; **92**: 1034-1043.

[63] Joseph, E.K., Green, P.G., Levine, J.D.: ATP release mechanisms of endothelial cell-mediated stimulus-dependent hyperalgesia. *J Pain* 2014; **15**: 771-7.

[64] Kaiser, R.A., Buxton, I.L.O.: Nucleotide-mediated relaxation in guinea-pig aorta: selective inhibition by MRS2179. *Br J Pharmacol* 2002; **135**: 537-545.

[65] Kanthi, Y., Hyman, M., Liao, H., Baek, A., Visovatti, S., Sutton, N., et al.: Abstract 13: Suppression of Atherosclerosis by CD39. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; **34**:.

[66] Kanthi, Y.M., Sutton, N.R., Pinsky, D.J.: CD39: Interface Between Vascular Thrombosis and Inflammation. *Curr Atheroscler Rep* 2014; **16**: 1-8.

[67] Kong, L., Luo, C., Li, X., Zhou, Y., He, H.: The anti-inflammatory effect of kaempferol on early atherosclerosis in high cholesterol fed rabbits. *Lipids Heal Dis* 2013; **12**: 115.

[68] Koszalka, P., Ozuyaman, B., Huo, Y.Q., Zernecke, A., Flogel, U., Braun, N., et al.: Targeted disruption of cd73/ecto-5 '-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* 2004; **95**: 814-821.

[69] Koupenova, M., Johnston-Cox, H., Vezeridis, A., Gavras, H., Yang, D., Zannis, V., et al.: A2b adenosine receptor regulates hyperlipidemia and atherosclerosis. *Circulation* 2012; **125**: 354-63.

[70] Krzeminski, P.: Receptory nukleotydowe w komórkach nowotworowych. *Postepy Biochem* 2014; **60**: 490-505.

[71] Kutryb-Zajac, B., Friebe, D., Alter, C., Goerldt, N., Zukowska, P., Jablonska, P., et al.: Extracellular nucleotides metabolism and resident immune cells in human calcific aortic valve. In: 6th Joint German-Italian Purine Club Meeting, International Conference on Purinergic Signalling, Hamburg, Germany, July 23-25, 2015. pp. 62-63 (2015).

[72] Kutryb-Zajac, B., Mateuszuk, L., Zukowska, P., Jasztal, A., Zabielska, M., Toczek, M., et al.: Increased activity of vascular adenosine deaminase in atherosclerosis and therapeutic potential of its inhibition. *Cardiovasc Res* 2016; **112**: 590-605.

[73] Lazarowski, E.R., Boucher, R.C., Harden, T.K.: Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X-and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* 2003; **64**: 785-795.

[74] Lecka, J., Bloch-Boguslawska, E., Molski, S., Komoszynski, M.: Extracellular purine metabolism in blood vessels (Part II): Activity of ecto-enzymes in blood vessels of patients with abdominal aortic aneurysm. *Clin Appl Thromb Hemost* 2010; **16**: 650-657.

[75] Lecka, J., Molski, S., Komoszynski, M.: Extracellular-Purine Metabolism in Blood Vessels (Part I). Extracellular-Purine Level in Blood of Patients with Abdominal Aortic Aneurysm. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* 2010; **29**: 647-657.
[76] Lee, S.H., Choi, J.-H.: Involvement of Immune Cell Network in Aortic Valve Stenosis: Communication between Valvular Interstitial Cells and Immune Cells. *Immune Netw* 2016; **16**: 26-32.
[77] Liu, A.C., Joag, V.R., Gotlieb, A.I.: The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol* 2007; **171**: 1407-1418.
[78] Lohman, A.W.: Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS Lett* 2014; **588**: 1379-1388.
[79] Lohman, A.W., Billaud, M., Isakson, B.E.: Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovasc Res* 2012; **95**: 269-80.
[80] Lomashvili, K.A., Narisawa, S., Millán, J.L., O'Neill, W.C.: Vascular calcification is dependent on plasma levels of pyrophosphate. *Kidney Int* 2014; **85**: 1351-6.
[81] Lusis, A.J.: Atherosclerosis. *Nature* 2000; **407**: 233-241.
[82] MacRae, N.C.W., Zhu, D., Longley, L., Patterson, C.S., Kommareddy, S., MacRae, V.E.: MOVAS-1 cell line: A new in vitro model of vascular calcification. *Int J Mol Med* 2011; **27**: 663-8.
[83] Maddux, B.A., Chang, Y.-N., Accili, D., McGuinness, O.P., Youngren, J.F., Goldfine, I.D.: Overexpression of the insulin receptor inhibitor PC-1/ENPP1 induces insulin resistance and hyperglycemia. *Am J Physiol – Endocrinol Metab* 2006; **290**:.
[84] Mahaut-Smith, M.P., Jones, S., Evans, R.J.: The P2X1 receptor and platelet function. *Purinergic Signal* 2011; **7**: 341-356.
[85] Mahmut, A., Boulanger, M.C., Boucharеb, R., Hadji, F., Mathieu, P.: Adenosine derived from ecto-nucleotidases in calcific aortic valve disease promotes mineralization through A2a adenosine receptor. *Cardiovasc Res* 2015.;
[86] Martin-Rojas, T., Mourino-Alvarez, L., Alonso-Orgaz, S., Rosello-Lleti, E., Calvo, E., Lopez-Almodovar, L.F., et al.: iTRAQ proteomic analysis of extracellular matrix remodeling in aortic valve disease. *Sci Rep* 2015; **5**: 17290.
[87] Martinez-Navio, J.M., Casanova, V., Pacheco, R., Naval-Macabuhay, I., Climent, N., Garcia, F., et al.: Adenosine deaminase potentiates the generation of effector, memory, and regulatory CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 2011; **89**: 127-136.
[88] Mazzone, A., Epistolato, M.C., Gianetti, J., Castagnini, M., Sassi, C., Ceravolo, R., et al.: Biologic Features (Inflammation and Neoangiogenesis) and Atherosclerotic Risk Factors in Carotid Plaques and Calcified Aortic Valve Stenosis. *Am J Clin Pathol* 2006; **126**: 494-502.
[89] Mediero, A., Cronstein, B.N.: Adenosine and bone metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2013; **24**: 290-300.
[90] Meghani, P.: The design of P2Y2 antagonists for the treatment of inflammatory diseases. *Abstr Pap Am Chem Soc* 2002; **224**: 12.
[91] Melzig, M.: Inhibition of Adenosine Deaminase Activity of Aortic Endothelial Cells by Selected Flavonoids. *Planta Med* 1996; **62**: 20-21.
[92] Mohler, E.R., Wang, H., Medenilla, E., Scott, C.: Effect of statin treatment on aortic valve and coronary artery calcification. *J Heart Valve Dis* 2007; **16**: 378-86.
[93] Mohler Iii, E.R.: Mechanisms of aortic valve calcification. *Am J Cardiol* 2004; **94**: 1396-1402.
[94] Mohty, D., Pibarot, P., Despres, J.-P., Cote, C., Arsenault, B., Cartier, A., et al.: Association Between Plasma LDL Particle Size, Valvular Accumulation of Oxidized LDL, and Inflammation in Patients With Aortic Stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **28**: 187-193.
[95] Montesinos, M.C., Takedachi, M., Thompson, L.F., Wilder, T.F., Fernández, P., Cronstein, B.N.: The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5′-nucleotidase: Findings in a study of ecto-5′-nucleotidase gene–deficient mice. *Arthritis Rheum* 2007; **56**: 1440-1445.
[96] 96. Nitschke, Y., Weissen-Plenz, G., Terkeltaub, R., Rutsch, F.: Npp1 promotes atherosclerosis in ApoE knockout mice. *J Cell Mol Med* 2011; **15**: 2273-83.

[97] Nitya Nand Kumar, M.P.N., N, N., Kumar: Valvular Aortic Stenosis: An Update. *J Vasc Med Surg* 2015; **3**:
[98] North, R.A.: Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol Rev* 2002; **82**: 1013-1067.
[99] North, R.A., Surprenant, A.: Pharmacology of Cloned P2X Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; **40**: 563-580.
[100] Novaro, G.M., Tiong, I.Y., Pearce, G.L., Lauer, M.S., Sprecher, D.L., Griffin, B.P.: Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis. *Circulation* 2001; **104**: 2205-9.
[101] Olanrewaju, H.A., Mustafa, S.J.: Adenosine A2A and A2B receptors mediated nitric oxide production in coronary artery endothelial cells. *Gen Pharmacol Vasc Syst* 2000; **35**: 171-177.
[102] Orriss, I.R., Burnstock, G., Arnett, T.R.: Purinergic signalling and bone remodelling. *Curr Opin Pharmacol* 2010; **10**: 322-330.
[103] Osman, L., Amrani, M., Ilsley, C., Yacoub, M.H., Smolenski, R.T.: Atorvastatin accelerates extracellular nucleotide degradation in human endothelial cells. *Mol Cell Biochem* 2008; **308**: 209-217.
[104] Osman, L., Chester, A.H., Amrani, M., Yacoub, M.H., Smolenski, R.T.: A novel role of extracellular nucleotides in valve calcification – A potential target for atorvastatin. *Circulation* 2006; **114**: I566-I572.
[105] Osman, L., Yacoub, M.H., Latif, N., Amrani, M., Chester, A.H.: Role of Human Valve Interstitial Cells in Valve Calcification and Their Response to Atorvastatin. *Circulation* 2006; **114**:.
[106] Otto, C.M., Kuusisto, J., Reichenbach, D.D., Gown, A.M., O'Brien, K.D.: Characterization of the early lesion of "degenerative" valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 1994; **90**: 844-53.
[107] Pan, C., Wei, X., Ye, J., Liu, G., Zhang, S., Zhang, Y., et al.: BF066, a Novel Dual Target Antiplatelet Agent without Significant Bleeding. 2008.
[108] Pan, W., Ciociola, E., Saraf, M., Tumurbaatar, B., Tuvdendorj, D., Prasad, S., et al.: Metabolic consequences of ENPP1 overexpression in adipose tissue. *Am J Physiol – Endocrinol Metab* 2011; **301**.
[109] Panahi, Y., Sahebkar, A., Taghipour, H.R., Dadjou, Y., Pishgoo, B., Rakhshankhah, A.S.: Atorvastatin therapy is not associated with slowing the progression of aortic stenosis: findings of a randomized controlled trial. *Clin Lab* 2013; **59**: 299-305.
[110] Parras, J.: Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol* 2012; **59**: 2122-2123.
[111] Patel, R.A.G., Glover, D.K., Broisat, A., Kabul, H.K., Ruiz, M., Goodman, N.C., et al.: Reduction in myocardial infarct size at 48 hours after brief intravenous infusion of ATL-146e, a highly selective adenosine A2A receptor agonist. *AJP Hear Circ Physiol* 2009; **297**: H637-H642.
[112] Pedroza, M., Schneider, D.J., Karmouty-Quintana, H., Coote, J., Shaw, S., Corrigan, R., et al.: Interleukin-6 contributes to inflammation and remodeling in a model of adenosine mediated lung injury. *PLoS One* 2011; **6**: e22667.
[113] Pelegrin, P., Surprenant, A.: Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J* 2006; **25**: 5071-82.
[114] Pentikäinen, M.O., Oörni, K., Ala-Korpela, M., Kovanen, P.T.: Modified LDL – trigger of atherosclerosis and inflammation in the arterial intima. *J Intern Med* 2000; **247**: 359-70.
[115] Pijacka, W., Moraes, D.J.A., Ratcliffe, L.E.K., Nightingale, A.K., Hart, E.C., da Silva, M.P., et al.: Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nat Med* 2016; **22**: 1151-1159.
[116] Pohle, K., Mäffert, R., Ropers, D., Moshage, W., Stilianakis, N., Daniel, W.G., et al.: Progression of aortic valve calcification association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors. *Circulation* 2001; **104**: 1927-1932.
[117] Prosdocimo, D.A., Douglas, D.C., Romani, A.M., O'Neill, W.C., Dubyak, G.R.: Autocrine ATP release coupled to extracellular pyrophosphate accumulation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; **296**: C828-39.

[118] Przybylski, R., Wilczek, K., Zembala, M., Nadzikiewicz, P., Nikleowski, T., Krason, M., et al.: Jak można bezpiecznie leczyć chorych najstarszych, obciążonych licznymi współistniejącymi chorobami, u których stwierdzono ciężką stenozę zastawki aortalnej? *Przew Lek GPs* 2009; **1**: 53-57.

[119] Rajamannan, N.M., Evans, F.J., Aikawa, E., Grande-Allen, K.J., Demer, L.L., Heistad, D.D., et al.: Calcific aortic valve disease: not simply a degenerative process: A review and agenda for research from the National Heart and Lung and Blood Institute Aortic Stenosis Working Group. Executive summary: Calcific aortic valve disease-2011 update. *Circulation* 2011; **124**: 1783-1791.

[120] Rajamannan, N.M., Subramaniam, M., Rickard, D., Stock, S.R., Donovan, J., Springett, M., et al.: Human Aortic Valve Calcification Is Associated With an Osteoblast Phenotype. *Circulation* 2003; **107**: 2181-2184.

[121] Rajamannan, N.M., Subramaniam, M., Springett, M., Sebo, T.C., Niekrasz, M., McConnell, J.P., et al.: Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced cellular proliferation and bone matrix production in the rabbit aortic valve. *Circulation* 2002; **105**: 2660-5.

[122] Ralevic, V., Burnstock, G.: Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect* 2003; **16**: 133-140.

[123] Ray, S.: Changing epidemiology and natural history of valvular heart disease. *Clin Med (Northfield Il)* 2010; **10**: 168-171.

[124] Reiss, A.B., Carsons, S.E., Anwar, K., Rao, S., Edelman, S.D., Zhang, H., et al.: Atheroprotective effects of methotrexate on reverse cholesterol transport proteins and foam cell transformation in human THP-1 monocyte/macrophages. *Arthritis Rheum* 2008; **58**: 3675-3683.

[125] Reiss, A.B., Cronstein, B.N.: Regulation of foam cells by adenosine. *Arter Thromb Vasc Biol* 2012; **32**: 879-886.

[126] Reiss, A.B., Rahman, M.M., Chan, E.S.L., Montesinos, M.C., Awadallah, N.W., Cronstein, B.N.: Adenosine A2A receptor occupancy stimulates expression of proteins involved in reverse cholesterol transport and inhibits foam cell formation in macrophages. *J Leukoc Biol* 2004; **76**: 727-734.

[127] Ren, T., Tian, T., Feng, X., Ye, S., Wang, H., Wu, W., et al.: An adenosine A3 receptor agonist inhibits DSS-induced colitis in mice through modulation of the NF-κB signaling pathway. *Sci Rep* 2015; **5**: 9047.

[128] Rosenhek, R., Rader, F., Loho, N., Gabriel, H., Heger, M., Klaar, U., et al.: Statins but Not Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Delay Progression of Aortic Stenosis. *Circulation* 2004; **110**: 1291-1295.

[129] Ross, R.: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; **340**: 115-126.

[130] Rossebø, A.B., Pedersen, T.R., Boman, K., Brudi, P., Chambers, J.B., Egstrup, K., et al.: Intensive Lipid Lowering with Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis. *N Engl J Med* 2008; **359**: 1343-1356.

[131] Sakaki, H., Tsukimoto, M., Harada, H., Moriyama, Y., Kojima, S., Cohen, J., et al.: Autocrine Regulation of Macrophage Activation via Exocytosis of ATP and Activation of P2Y11 Receptor. *PLoS One* 2013; **8**: e59778.

[132] Sánchez, P.L., Santos, J.L., Kaski, J.C., Cruz, I., Arribas, A., Villacorta, E., et al.: Relation of Circulating C-Reactive Protein to Progression of Aortic Valve Stenosis. *Am J Cardiol* 2006; **97**: 90-93.

[133] Sathanoori, R., Swärd, K., Olde, B., Erlinge, D.: The ATP Receptors P2X7 and P2X4 Modulate High Glucose and Palmitate-Induced Inflammatory Responses in Endothelial Cells. *PLoS One* 2015; **10**: e0125111.

[134] Serrano, R.L., Yu, W., Terkeltaub, R., Shanahan, C.M., Crouthamel, M.H., Kapustin, A., et al.: Mono-allelic and bi-allelic ENPP1 deficiency promote post-injury neointimal hyperplasia associated with increased C/EBP homologous protein expression. *Atherosclerosis* 2014; **233**: 493-502.

[135] Sheen, C.R., Kuss, P., Narisawa, S., Yadav, M.C., Nigro, J., Wang, W., et al.: Pathophysiological role of vascular smooth muscle alkaline phosphatase in medial artery calcification. *J Bone Miner Res* 2015; **30**: 824-36.

[136] Shintani-Ishida, K., Uemura, K., Yoshida, K.: Hemichannels in cardiomyocytes open transiently during ischemia and contribute to reperfusion injury following brief ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; **293**: H1714-20.

[137] Siddaramappa Umapathy, N., Kaczmarek, E., Fatteh, N., Burns, N., Lucas, R., Stenmark, K.R., et al.: Adenosine A1 Receptors Promote Vasa Vasorum Endothelial Cell Barrier Integrity via Gi and Akt-Dependent Actin Cytoskeleton Remodeling. *PLoS One* 2013; **8**: e59733.

[138] Singh, R.B., Mengi, S.A., Xu, Y.J., Arneja, A.S., Dhalla, N.S.: Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp Clin Cardiol* 2002; **7**: 40-53.

[139] Stachon, P., Peikert, A., Michel, N.A., Hergeth, S., Marchini, T., Wolf, D., et al.: P2Y6 deficiency limits vascular inflammation and atherosclerosis in mice. *Arter Thromb Vasc Biol* 2014; **34**: 2237-2245.

[140] St Hilaire, C., Ziegler, S.G., Markello, T.C., Brusco, A., Groden, C., Gill, F., et al.: NT5E mutations and arterial calcifications. *N Engl J Med* 2011; **364**: 432-442.

[141] Šteiner, I., Krbal, L., Rozkoš, T., Harrer, J., Laco, J.: Calcific aortic valve stenosis: Immunohistochemical analysis of inflammatory infiltrate. *Pathol – Res Pract* 2012; **208**: 231-234.

[142] Stenmark, K.R., Yeager, M.E., El Kasmi, K.C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E. V, Li, M., et al.: The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol* 2013; **75**: 23-47.

[143] Szaboâ, C., Scott, G.S., Szloâ Viraâ, L., Egnaczyk, G., Salzman, A.L., Shanley, T.P., et al.: Suppression of macrophage inammatory protein (MIP)-1a production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists. *Br J Pharmacol* 1998; **125**: 379-87.

[144] Teng, B., Smith, J.D., Rosenfeld, M.E., Robinet, P., Davis, M.E., Morrison, R.R., et al.: A1 adenosine receptor deficiency or inhibition reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E deficient mice. *Cardiovasc Res* 2014; **102**: 157-165.

[145] Teng, B., Smith, J.D., Rosenfeld, M.E., Robinet, P., Davis, M.E., Morrison, R.R., et al.: A1 adenosine receptor deficiency or inhibition reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E deficient mice. *Cardiovasc Res* 2014; **102**:.

[146] Tesch, A.M., MacDonald, M.H., Kollias-Baker, C., Benton, H.P.: Endogenously produced adenosine regulates articular cartilage matrix homeostasis: enzymatic depletion of adenosine stimulates matrix degradation. *Osteoarthr Cartil* 2004; **12**: 349-359.

[147] Thanassoulis, G., Massaro, J.M., Cury, R., Manders, E., Benjamin, E.J., Vasan, R.S., et al.: Associations of long-term and early adult atherosclerosis risk factors with aortic and mitral valve calcium. *J Am Coll Cardiol* 2010; **55**: 2491-2498.

[148] Thompson, L.F., Eltzschig, H.K., Ibla, J.C., Van De Wiele, C.J., Resta, R., Morote-Garcia, J.C., et al.: Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med* 2004; **200**: 1395-1405.

[149] Toczek, M., Kutryb-Zajac, B., Kapczynska, M., Lipinski, M., Slominska, E.M., Smolenski, R.T.: Extracellular adenine nucleotide catabolism in heart valves. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2014; **33**: 329-332.

[150] Towler, D.A.: Inorganic pyrophosphate: a paracrine regulator of vascular calcification and smooth muscle phenotype. *Arter Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 651-654.

[151] Tsukamoto, H., Chernogorova, P., Ayata, K., Gerlach, U. V., Rughani, A., Ritchey, J.W., et al.: Deficiency of CD73/ecto-5′-nucleotidase in mice enhances acute graft-versus-host disease. *Blood* 2012; **119**: 4554-64.

[152] Vaiyapuri, S., Flora, G.D., Gibbins, J.M.: Gap junctions and connexin hemichannels in the regulation of haemostasis and thrombosis. *Biochem Soc Trans* 2015; **43**: 489-94.

[153] Wang, H., Zhang, W., Tang, R., Zhu, C., Bucher, C., Blazar, B., et al.: Adenosine Receptor A 2A Deficiency in Leukocytes Increases Arterial Neointima Formation in Apolipoprotein E–Deficient Mice.

[154] Wang, H., Zhang, W., Zhu, C., Bucher, C., Blazar, B.R., Zhang, C., et al.: Inactivation of the adenosine A2A receptor protects apolipoprotein E-deficient mice from atherosclerosis. *Arter Thromb Vasc Biol* 2009; **29**: 1046-1052.
[155] Weber, C., Noels, H.: Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011; **17**: 1410-22.
[156] Yacoub, M.H., Cohn, L.H.: Novel Approaches to Cardiac Valve Repair: From Structure to Function: Part II. *Circulation* 2004; **109**: 1064-1072.
[157] Yegutkin, G.G.: Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta-Molecular Cell Res* 2008; **1783**: 673-694.
[158] Yegutkin, G.G., Mikhailov, A., Samburski, S.S., Jalkanen, S.: The detection of micromolar pericellular ATP pool on lymphocyte surface by using lymphoid ecto-adenylate kinase as intrinsic ATP sensor. *Mol Biol Cell* 2006; **17**: 3378-3385.
[159] Yonemura, A., Momiyama, Y., Fayad, Z.A., Ayaori, M., Ohmori, R., Kihara, T., et al.: Effect of lipid-lowering therapy with atorvastatin on atherosclerotic aortic plaques: a 2-year follow-up by noninvasive MRI. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009; **16**: 222-228.
[160] Yu-Guo, C., Feng, X., Zhang, Y., Qiu-Shang, J., Yi, S., Lü, R.-J., et al.: Effect of aspirin plus clopidogrel on inflammatory markers in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. *Chin Med J* 2006; **119**: 32-36.
[161] Zahler, S., Becker, B.F., Raschke, P., Gerlach, E.: Stimulation of endothelial adenosine A1 receptors enhances adhesion of neutrophils in the intact guinea pig coronary system. *Cardiovasc Res* 1994; **28**: 1366-72.
[162] Zawierucha, P., Kempisty, B., Sosinska, P., Wojtowicz, K., Nowicki, M., Witkiewicz, W.: Molekularne mechanizmy procesów angiogennych i ich udział w patogenezie miażdżycy. *Postępy Biol Komórki* 2012; **4**:.
[163] Zhou, X., Nicoletti, A., Elhage, R., Hansson, G.K.: Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 2000; **102**: 2919-22.
[164] Ziaeian, B., Fonarow, G.C.: Epidemiology and aetiology of heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2016; **13**: 368-378.
[165] Żukowska, P., Kutryb-Zajac, B., Jasztal, A., Toczek, M., Zabielska, M., et al.: Deletion of CD73 in mice leads toaortic valve disfunction. *Biochim Biophys Acta* 2017; **1863**: 1464-1472.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 13.12.2016
Przyjęto: 30.01.2017
Ryszard. T. Smoleński, Barbara Kutryb-Zając
Katedra i Zakład Biochemii
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
tel. (58) 349 14 60, (58) 349 14 64fax. (58) 349 14 65
e-mail: rt.smolenski@gumed.edu.pl, b.kutryb-zajac@gumed.edu.pl