

Received: 2014.02.21
Accepted: 2015.04.27
Published: 2012.07.14

Współczesne koncepcje w badaniach nad cyklicznym AMP i jego rolą w reakcji zapalnej*

Contemporary concepts in studies on cyclic AMP and its role in the inflammatory reaction

Krzysztof Pociecha, Katarzyna Przejczowska-Pomierny, Agnieszka Cios, Elżbieta Wyska

Zakład Farmakokinytyki i Farmacji Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum w Krakowie

Streszczenie

Wprawdzie od odkrycia cyklicznego AMP (cAMP) minęło już ponad 50 lat, jednak wciąż pojawiają się doniesienia o nowych, nieznanych dotąd funkcjach tego nukleotydu. cAMP powstaje z adenozyno-5'-trifosforanu w reakcji katalizowanej przez enzym cyklazę adenylową. W komórkach ssaków występuje dziewięć membranowych oraz jedna rozpuszczalna izoforma cyklazy adenylowej. Większość z nich współdziała z receptorami sprzężonymi z białkami G_s lub G_i . Jedynym sposobem degradacji cAMP jest reakcja hydrolizy katalizowana przez fosfodiesterazę. U ludzi wyróżnia się 11 rodzin tych enzymów, które różnią się powinowactwem do substratów, strukturą, miejscem występowania oraz mechanizmem regulacji. Modulacja ich aktywności jest ważnym kierunkiem w poszukiwaniu nowych leków. Efektorami cAMP są: kinaza proteinowa A (PKA), białka Epac oraz kanały jonowe zależne od cAMP. W przebiegu reakcji zapalnej, wzrost stężenia cAMP może prowadzić do wzrostu ekspresji IL-10 oraz hamowania uwalniania TNF- α , IL-12 i chemokiny MIP-1 β , a także do zmniejszenia przepuszczalności naczyń. Ponadto nukleotyd ten reguluje proces fagocytozy. Natomiast działając przez PKA przeważnie przyspiesza proces apoptozy, a aktywując Epac hamuje śmierć komórki. Jak wykazano, stężenia cAMP różnią się w poszczególnych przestrzeniach wewnątrzkomórkowych, dzięki nierównomiernemu umiejscowieniu białek odpowiadających za jego syntezę i rozkład. cAMP jest transportowany na zewnątrz komórki z udziałem dwóch transporterów: ABCC4 i ABCC5. Stwierdzono występowanie ścieżki enzymatycznej odpowiedzialnej za pozakomórkowy rozkład cAMP. Po podaniu związków modulujących poziom cAMP gryzoniom, stężenia tego nukleotydu ulegają zmianom we krwi i/lub tkankach zwierząt. Postęp w badaniach nad cAMP stał się możliwy w dużym stopniu dzięki pojawieniu się nowych metod analitycznych do oznaczenia jego stężeń w materiale biologicznym.

Słowa kluczowe:

cykliczny AMP • cyklaza adenylowa • fosfodiesteraza • receptory sprzężone z białkiem G • zapalenie • apoptoza • transportery nukleotydów

Summary

Although cyclic AMP (cAMP) was discovered more than 50 years ago, new reports of unknown functions of this nucleotide still appear in the literature. It is synthesized from adenosine triphosphate in a reaction catalysed by adenylyl cyclase. In mammalian cells nine membrane-associated and one soluble adenylyl cyclase isoforms occur. Most of them interact with G_s - or G_i -protein coupled receptors. The only way of cAMP degradation is the reaction of hydrolysis catalysed by phosphodiesterase. In humans there are 11 families of these enzymes, which differ

*Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu ze środków na działalność statutową Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum K/ZDS/001916 (EW) oraz z dotacji celowej na rozwój młodych naukowców K/DSC/001422 (KP).

in substrate affinity, structure, place of occurrence and mechanism of regulation. Modulation of activity of these enzymes is an important direction in the search for new drugs. The effectors of cAMP are: protein kinase A (PKA), Epac proteins, and cAMP-dependent ion channels. In the course of the inflammatory response, the increase in cAMP level may lead to an increase in IL-10 expression, inhibition of TNF- α , IL-12, and MIP-1 β release, as well as to a reduction in the permeability of blood vessels. In addition, cAMP regulates the process of phagocytosis. In the majority of cases, acting via PKA it induces cell apoptosis, and by activating Epac proteins it inhibits cell death. It has been shown that the levels of cAMP vary in different intracellular spaces due to the discretely positioned proteins responsible for its synthesis and breakdown. Moreover, the enzymatic pathway responsible for the extracellular degradation of cAMP has been discovered. Two transporters, ABCC4 and ABCC5, are involved in the transport of cAMP outside the cells. Administration of drugs modulating the level of this nucleotide to rodents leads to changes in its concentrations in blood and/or animal tissues. Progress in research on cAMP has become possible to a large extent due to the emergence of new analytical methods for the determination of its concentrations in biological material.

Keywords: cyclic AMP • adenylyl cyclase • phosphodiesterase • G-protein coupled receptors • inflammation • apoptosis • nucleotide transporters

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1161412>

Word count: 7783
Tables: 6
Figures: 4
References: 120

Adres autorki: dr hab. Elżbieta Wyska, prof. UJ, Zakład Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, e-mail: mfwyska@cyf-kr.edu.pl

WSTĘP

Cykliczny 3',5'-adenozynomonofosforan (cAMP) to niezwykle uniwersalny wtórny przekaźnik wewnątrzkomórkowy, uczestniczący w regulacji wielu procesów, takich jak: metabolizm, apoptoza, ekspresja genów oraz proliferacja komórek. Mimo iż od odkrycia i opisanie funkcji cAMP w mechanizmie działania hormonów peptydowych minęło już ponad 50 lat, to wciąż pojawiają się doniesienia o nieznanym dotąd jego funkcjach. W ostatnich latach wykazano np., że cAMP może być mediatorem procesów przeciwnych (np. działanie pro- i przeciwapoptotyczne), co jest możliwe dzięki złożonemu systemowi precyzyjnego sterowania stężeniem tego związku w różnych obszarach komórki [47,117]. Odkrycie kompartmentalizacji białek odpowiedzialnych za rozpad, syntezę i przekazywanie sygnału cAMP stanowiło przełom w badaniach nad tym nukleotydem. Mimo intensywnej pracy badaczy, wiedza nad wieloma receptorami sprzężonymi z białkiem G oraz rolą cAMP w regulacji pewnych mechanizmów wciąż nie jest pełna.

W latach 50. XX w. Earl Sutherland podjął badania nad wyjaśnieniem mechanizmu działania adrenaliny i glu-

kagonu w procesie rozpadu glikogenu w wątrobie. Wyniki badań wykazały, że regulatorową funkcję w tym procesie odgrywa fosforylaza, którą aktywują adrenalina i glukagon w wyniku fosforylacji. Inaktywacja enzymu zachodzi zaś przez defosforylację. Zauważono, że stymulacja hormonalna białek związanych z błoną komórkową doprowadza do pojawienia się odpornego na temperaturę czynnika powodującego fosforylację (aktywację) fosforylasy. Wyniki dwóch niezależnych grup badaczy: Sutherlanda i Lipkina doprowadziły, z pomocą Heppela, do ustalenia budowy chemicznej tego czynnika jako 3',5'-cyklicznego adenzynomonofosforanu [20,95].

Odkrycia następnego lat wykazały, że cAMP uczestniczy nie tylko w rozpadzie glikogenu, ale także w lipolizie, glukoneogenezie, ketogenezie, uwalnianiu insuliny przez trzustkę oraz wielu innych procesach metabolicznych. W komórkach bakteryjnych wzrost stężenia cAMP jest sygnałem spadku stężenia glukozy stymulującym ekspresję genów kodujących enzymy uczestniczące w pozyskiwaniu energii z innych źródeł [102]. W mięśniach i wątrobie ssaków nukleotyd zachował charakter sygnalizatora głodu, blokując pośrednio syntezę gliko-

geny oraz stymulując transkrypcję genów enzymów odpowiedzialnych za glukoneogenezę [23].

Jak wiadomo, cAMP powstaje z adenozyνο-5'-trifosforanu (ATP) w reakcji katalizowanej przez cyklazę adenyłową (AC). Reakcja zachodzi z udziałem jonów magnezu, z jednoczesnym uwolnieniem pirofosforanu (PPi). Jediną metodą degradacji cAMP jest reakcja hydrolizy katalizowana przez fosfodiesterazę (PDE) (ryc. 1) [23].

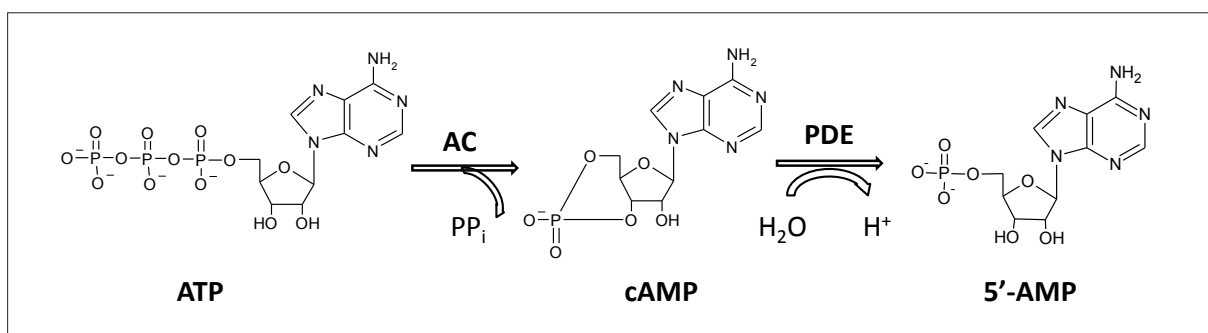
Większość izoform AC współdziała z niektórymi recepto-rami sprzężonymi z białkiem G (GPCRs, G protein-coupled receptors), których pobudzenie może spowodować wzrost lub zahamowanie aktywności katalitycznej tego enzymu [23].

RECEPTORY SPRĘŻONE Z BIAŁKIEM G

Receptory sprzężone z białkiem G to rodzina recepto-rów błonowych obejmująca ponad 1000 różnych białek. Prawie połowa najczęściej stosowanych leków to ligandy GPCRs. Mimo trwających od lat intensywnych badań nad poznaniem ich budowy i funkcji, w dalszym ciągu na temat wielu z nich nie ma pełnych danych (receptory sieroce). Białko G jest ogniwem łączącym przekaznictwo receptorów GPCR z efektorami wewnątrzkomórkowymi. Zbudowane z trzech podjednostek: α , β i γ , w stanie nieaktywnym białko występuje w postaci heterodimeru, a do podjednostki α jest przyłączony guanozyνο-5'-difosforan (GDP). Za kodowanie podjednostki α jest odpowiedzialnych szesnaście genów, pięć za kodowanie β , a dwanaście za kodowanie γ . Białka G podzielono na cztery rodziny uwzględniając ich funkcję i budowę podjednostki α : G_s , G_i , G_q i G_{12} . Podjednostka α składa się z dwóch domen: pierwsza wykazuje aktywność GTP-azową, natomiast druga pozwala na utrzymanie guanozyνο-5'-trifosforanu (GTP) wewnątrz białka. Po aktywacji białka G przez receptor dochodzi do odszczepienia podjednostki α i odłączenia GDP. Uważa się, że receptor może używać dimeru $\beta\gamma$ jak dźwigni, by wywołać zmiany konformacyjne powodujące uwolnienie GDP. Receptory GPCR biorą udział w wymianie GDP na GTP. Poszczególne białka G działają na różne efekторы, np. podtypy G_s są kojarzone głównie ze stymulacją cyklazy adenyłowej, ale uczestniczą także w regulacji GTP-azy tubuliny oraz kinazy tyrozynowej src. G, odgrywają rolę, m.in. w hamowaniu cyklazy adenyłowej oraz regulacji

funkcji białka Rap, kanałów wapniowych i potasowych oraz fosfodiesterazy 3',5'-cyklicznego guanozynomono-fosforanu (cGMP). Efektorami G_q są fosfolipaza C i kinaza tyrozynowa Brutona. Fosfolipaza C katalizuje rozpad fosfatydyloinozytolo-4, 5-bisfosforanu do 1,2-diacyloglicerolu (DAG) i inozytolo-1, 4, 5-trifosforanu (IP_3), które są istotnymi przekazywaczami drugiego rzędu [96]. Grupa G_{12} bierze udział w aktywacji wymiennika Na^+/H^+ fosfolipazy D oraz syntazy tlenku azotu. Uważano, że tylko podjednostka α ma możliwość przekazywania sygnału (np. stymulacja i hamowanie cyklazy adenyłowej). Dziś wiadomo, że dimer $\beta\gamma$ także bierze udział w regulacji funkcji wielu innych białek, takich jak fosfolipaza C, kinaza receptorów GPCR, kalmodulina, dynamina i tubulina. Główną rolę w regulacji czasu trwania aktywnej postaci białka G odgrywa GTP-azowa domena podjednostki α . Efekторы białka G (np. podjednostka γ i fosfodiesterazy lub fosfolipaza C β) mogą zwrotnie nasilać wewnętrzną aktywność GTP-azową, skracając tym samym czas przekazywania sygnału. Oprócz czynników efektorowych opisano grupę białek regulujących przekazywanie sygnału przez białka G (RGS, regulators of G protein signaling), które także wzmacniają aktywność GTP-azową. Regulacja funkcji białek G może odbywać się także przez fosforylację, acylację i lipidację odpowiednich podjednostek. Fosforylacja przez kinazę proteinową C może osłabiać działanie podjednostki α na efekторы i zapobiegać tworzeniu trimeru, nasilając działanie dimeru $\beta\gamma$, a także zmieniać selektywność efektorową dimeru $\beta\gamma$ [13].

Pojawiające się dowody na istnienie ścieżek sygnałowych niezależnych od białka G doprowadziły do wprowadzenia nowej nazwy GPCRs: receptory 7TM (7 transmembrane receptors, receptory o siedmiu domenach transmembranowych). GPCRs są zbudowane z siedmiu hydrofobowych domen transmembranowych, wewnątrzkomórkowego końca karboksylowego oraz zewnątrzkomórkowego końca aminowego. Białka te wykazują dobrą homologię pod względem budowy domen transmembranowych. Największe zróżnicowanie obserwuje się w rejonie końca aminowego. Wiedza na temat budowy receptorów GPCR ma swoje źródło w badaniach nad strukturą krystaliczną rodopsyny wołowej. Jest to jedno z niewielu białek tej rodziny, którego strukturę zbadano technikami o wysokiej rozdzielczości. Rodopsyna występuje



Ryc. 1. Synteza i degradacja cAMP

w dużych ilościach w siatkówce oka i wykazuje niezwykłą stabilność. Najnowsze badania dowodzą, że GPCR mogą tworzyć oligomery, co może być istotne dla aktywacji białka G [57]. Badania filogenetyczne pozwoliły wyróżnić pięć rodzin białek GPCR: rodzina receptorów glutaminergicznych, rodopsynopodobnych, adhezyjnych, frizzled/taste 2 i sekretynopodobnych. Od pierwszych liter rodzin powstała nazwa nowej klasyfikacji białek – GRAFS. Do rodziny glutaminergicznej zalicza się metabotropowe receptory glutaminergiczne (mGluR), receptory GABA_B, receptor wrażliwy na wapń (CaSR) oraz receptory smakowe 1 (TAS1). Rodzina rodopsyny zawiera największą, bo liczącą 672, liczbę receptorów, charakteryzujących się pewnymi cechami wspólnymi, jak występowaniem motywów NSxxNPxxY oraz DRY (Asp-Arg-Tyr). Wyróżnia się ich cztery grupy: α , β , γ i δ . Grupa α została podzielona na podgrupy: prostaglandynową, aminową, podgrupę opsyn (podstawowa w odbieraniu wrażeń wzrokowych), melatoninową oraz MECA (np. receptory kanabinoidowe i adenozynowe). Wśród receptorów prostanoidów (prostaglandyn, tromboksanów i prostacyklin) zidentyfikowano cztery receptory prostaglandyny E (EP1-4), dwa receptory prostaglandyny D (DP, CRTH), jeden receptor prostaglandyny F, jeden receptor prostacykliny (IP) oraz jeden receptor tromboksanu A (TP) występujący w wariantach splicingowych α i β [41]. W skład podgrupy aminowej wchodzi bardzo istotne, z farmakologicznego punktu widzenia, receptory serotoninergiczne, dopaminergiczne, adrenergiczne, histaminowe i inne. Grupa β zawiera m.in. receptory tachykininy, neuropeptydu FF i cholecystokininy. Grupa γ składa się z trzech podgrup: SOG (somatostatin/opioid/galanin), MCH (melanin-concentrating hormone receptors) oraz podgrupy receptorów chemokinowych. W ostatniej grupie δ można wyodrębnić podgrupę receptorów związanych z MAS, glikoproteinową (receptory FSH, LH i TSH), purynową (np. P2Y) oraz węchową. Przedstawicielami rodziny receptorów adhezyjnych są np. receptor antygeny CD97, lektomedyny i mucynopodobne receptory zawierające moduł EGF (EMRs). Jedną z najpóźniej odkrytych rodzin jest rodzina receptorów frizzled/taste 2 składająca się z 36 przedstawicieli zebranych w dwie podgrupy: frizzled - uczestniczących w przekaźnictwie Wnt oraz taste 2 (TAS2), odpowiedzialnych za odczuwanie gorzkiego smaku. U człowieka znanych jest dziesięć receptorów frizzled (Frizzled 1-10) [86]. Receptory sekretynopodobne obejmują receptory glukagonu, hormonu uwalniającego kortykotropinę, kalcytoniny, parathormonu, sekretyny i innych peptydów [34].

Jak wspomniano wyżej, pobudzenie receptorów sprzężonych z białkami G_s lub G_i prowadzi odpowiednio do wzrostu lub obniżenia stężenia cAMP w komórce. Przykłady takich receptorów przedstawiono w tabeli 1.

Zakres ligandów receptorów GPCR jest bardzo szeroki, są to: fotony, jony (Ca²⁺), aminy (noradrenalina, adrenalina, dopamina, serotonina, histamina), aminokwasy (glutaminian, GABA), lipidy (LPA, PAF, prostaglandyny,

leukotrieny, amandamina, S1P), peptydy i białka (angiotensyna, bradykinina, trombina, bombezyna, FSH, LH, TSH, endorfiny) oraz inne organiczne cząsteczki (feromony, nukleotydy, opioidy i kanabinoidy). Miejscem połączenia z ligandem może być koniec aminowy (szczególnie w przypadku peptydów), domena transmembranowa lub sekwencja zewnątrzkomórkowa. Mimo znacznego zróżnicowania ligandów (tabela 1), receptory GPCR współdziałają z białkami G o znacznej homologii. Sugeruje to duże podobieństwo w zmianach konformacyjnych wywołanych aktywacją w obrębie części cytoplazmatycznej różnych receptorów. W stosunkowo dobrze poznanym receptorze β_2 -adrenergicznym połączenie noradrenaliny z domeną 5, 6 oraz 3 prowadzi do zbliżenia tych domen i ustabilizowania postaci receptora umożliwiającej interakcję z białkiem G. Szczegółowe badania wykazały, iż azot aminowy łączy się z Asp 113 w domenie TM3, grupy hydroksylowe katecholu z serynami w TM5, zaś pierścień aromatyczny i grupa beta hydroksylowa odpowiednio z Phe 290 oraz Asn 293 w domenie TM6 [57]. Ważne znaczenie w interakcji lek-receptor ma układ przestrzenny ligandów. Dowiedziono np, że enancjomer (-) adrenaliny obkurcza naczynia bardziej od enancjomeru (+), co tłumaczy się jego większym powinowactwem do receptora adrenergicznego β_2 . Natomiast (R,R)-fenoterol łącząc się z receptorem β_2 aktywuje podjednostki białka G_s (stymulującej aktywność AC), a jego stereoisomer (S,R) pobudza zarówno G_s, jak i G_i (podjednostkę hamującą aktywność AC), co przejawia się w jego słabszym działaniu [89]. Zjawisko to tłumaczy się występowaniem różnic konformacyjnych receptorów GPCR pod wpływem danego stereoisomeru [109], a jak wiadomo, aktywacja określonych podjednostek białek G zależy od przestrzennego ułożenia receptora. Modulacja allosteryczna odbywa się również w przypadku dimeryzacji czy oligomeryzacji receptorów. Za przykład może posłużyć receptor kanabinoidowy CB1: aktywacja pojedynczego receptora hamuje AC przez podjednostkę G_i, natomiast dimeryzacja z receptorem dopaminowym D₂ czy opioidowym μ , promuje oddziaływanie z podjednostką G_s, co przejawia się wzrostem cAMP w komórce. Ponadto dimeryzacja CB1 z receptorem adrenergicznym β_2 nasila oddziaływanie z podjednostką G_i i blokuje aktywację G_s [77].

Funkcja receptorów GPCR może być modulowana przez wiele czynników. Kinazy GRK fosforylują receptory GPCR prowadząc do osłabienia oddziaływania z białkiem G i nasilenia wiązania z arrestynami – białkami kotwiczącymi, które mają zdolność inicjowania endocytozy receptora. Poszczególne receptory mogą mieć swoje własne mechanizmy regulacji, czego przykładem jest receptor parathormonu PTH1R. Aktywuje podjednostkę G_s, jednak w obecności czynnika regulującego wymianę Na⁺-H⁺ (NHERF) dochodzi do preferencyjnej aktywacji G_q [83].

ENZYMY UCZESTNICZĄCE W SYNTEZIE I DEGRADACJI cAMP

Cyklaza adenylowa

Tabela 1. Charakterystyka wybranych receptorów związanych z białkiem G oraz ich wpływ na poziom cAMP w komórce

RECEPTORY GPCR AKTYWUJĄCE CYKLAZĘ ADENYLOWĄ I ZWIĘKSZAJĄCE STĘŻENIE cAMP W KOMÓRKACH DOCELOWYCH					
RECEPTOR (RODZINA RECEPTORÓW)	LOKALIZACJA	FUNKCJA	AGONIŚCI	ANTAGONIŚCI	PIŚM.
PAC1-R [receptor polipeptydu przysadkowego aktywującego cyklazę adenylową] (RECEPTOR SEKRETYNOPODOBNY)	mózg (najobficiej w: opuszcze węchowej, wzgórze, podwzgórze, zakręcie zębatym); trzustka; rdzeń nadnerczy; makrofagi; monocyty	kontrola rytmu dobowego i zachowań emocjonalnych; wydzielanie neuropeptydów podwzgórzowych; reakcja lękowa; kontrola uwalniania insuliny przez trzustkę; uwalnianie katecholamin z rdzenia nadnerczy; hamowanie uwalniania IL-6 przez komórki immunologiczne	PACAP (polipeptyd przysadkowy aktywujący AC); maxadilan; PACAP 1-27; PACAP 1-38	PACAP 6-38; M65	[40,105]
GCCR [receptor dla glukagonu] (RECEPTOR SEKRETYNOPODOBNY)	hepatocyty; adipocyty; serce; nerki; mózg; komórki β trzustki; mięśniówka gładka przewodu pokarmowego	pobudzenie glikogenolizy, glukoneogenezy i ketogenezy w wątrobie oraz lipolizy w wątrobie i tkance tłuszczowej; działanie chrono- i inotropowo dodatnie na mięsień sercowy; wzrost wydzielania insuliny i somatostatyny przez trzustkę; termogeneza	Glukagon; podwójni peptydowi agoniści GCCR/GLP-1: TT-401 (w II fazie badań klinicznych u pacjentów z cukrzycą typu 2) i ZP-2929 (w I fazie badań klinicznych)	LY-2409021 (w II fazie badań klinicznych u pacjentów z cukrzycą typu 2)	[2, 101, 106, 120]
EP ₂ i EP ₄ [receptory prostaglandynowe] (RODZINA RODOPSYNY/PDGRU-PA PROSTAGLANDYNOWA)	mięśniówka gładka naczyń, oskrzeli, przewodu pokarmowego; centralny i obwodowy układ nerwowy; nerki; ciała jamiste prącia; macica; leukocyty; erytrocyty; płytki krwi; śródbłonek naczyń; kości	EP ₂ i EP ₄ ; rozszerzenie naczyń krwionośnych oraz oskrzeli; osłabianie aktywności komórek układu immunologicznego; hamowanie agregacji płytek krwi; ból zapalny wraz ze zjawiskiem nadwrażliwości; neuroprotekcja (EP ₄); formowanie kości EP ₄ : Zwiększenie wydzielania kwasu i śluzu żołądkowego oraz śluzu w jelicie cienkim i grubym; hipertrofia serca	Prostaglandyny (głównie PGE ₂); EP ₂ : butaprost; ONO-AE1-259; CAY-10399 EP ₄ : ONO-AE1-329; tetrazoloPGE1	AH23848 (EP ₄); AH6809 (EP ₂)	[32, 50, 52, 110]
β_2 [receptor adrenergiczny] (RODZINA RODOPSYNY/PDGRU-PA AMINOWA)	mięśniówka gładka: naczyń krwionośnych, oskrzeli, przewodu pokarmowego, macicy, wypieracza moczu, dróg nasiennych, mięśnia rzeszkowego; mięśnie szkieletowe; wątroba; zakończenia nerwowe adrenergiczne; komórki immunologiczne	rozkurcz mięśniówki gładkiej; drżenia mięśni szkieletowych; glikogenoliza w mięśniach szkieletowych i w wątrobie; wzrost wydzielania przez neurony adrenergiczne; zahamowanie uwalniania mediatorów zapalenia, proliferacji, chemotaksji i adhezji komórek immunologicznych	adrenalina (A); noradrenalina (NA); (A >> NA) izoprenalina; salbutamol; fenoterol; terbutalina; salmeterol; formoterol; glycopyrronium; GSK-573719	butoksamina	[63,99]
A _{2A} [receptor adenylozynowy] (RODZINA RODOPSYNY/ PDGRU-PA MECA)	komórki immunologiczne; mózg; grasica; śledziona; mięśniówka gładka naczyń krwionośnych; płytki krwi; serce; płuca; neurony obwodowe	hamowanie aktywności komórek immunologicznych (głównie neutrofilów) oraz agregacji płytek krwi; rozkurcz naczyń krwionośnych (w tym naczyń wieńcowych); neurodegeneracja	adenozyna; regadenozon; sonedenozon; binodenozon	metyloksantyny, np.: kofeina, teofilina (nieselektywne); ZM241385; istradefilina (KW 6002)	[33,85]

RECEPTORY GPCR HAMUJĄCE CYKLAZĘ ADENYLOWĄ I ZMNIJSZAJĄCE STĘŻENIE cAMP W KOMÓRKACH DOCELOWYCH

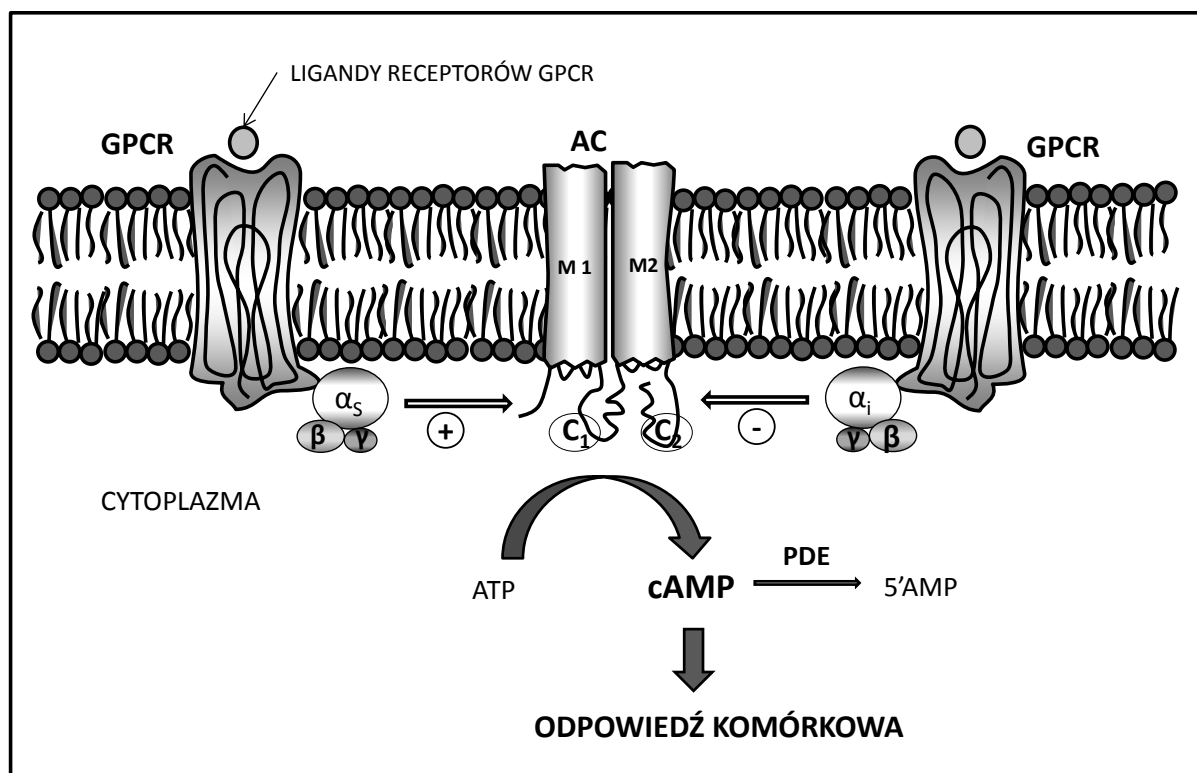
RECEPTOR (RODZINA RECEPTORÓW)	LOKALIZACJA	FUNKCJA	AGONIŚCI	ANTAGONIŚCI	PISM.
GABA _B [receptor GABA-ergiczny] (RODZINA GLUTAMINERGICZNA)	pre- i postsynaptyczna błona neuronów w CSN	hamowanie presynaptyczne uwalniania neuromediatorów (głównie wskutek zmniejszenia napływu Ca ²⁺); hamowanie postsynaptyczne (głównie wskutek otwarcia kanałów K ⁺)	GABA; baklofen; lesogaberan; CGP27492	faklofen; CGP55845A; CGP56433A	[59]
EP3 [receptor prostaglandynowy] (RODZINA RODOPSYNY/PODGRUPA PROSTAGLANDYNOWA)	mięśniówka gładka przewodu pokarmowego i naczyń krwionośnych; mózg (wzgorze); macica; nerki; płytki krwi	zmniejszenie wydzielania kwasu żołądkowego, oraz zwiększenie wydzielania śluzu żołądkowego; skurcz mięśni gładkich przewodu pokarmowego; skurcz ciężarnej macicy; agregacja płytek krwi	PGE2=PGE1 >> Iloprost > PGD2 Dinoproston; Sulproston (agonista receptorów EP1/EP3); ONO-AE-248	DG-041 (w badaniach klinicznych jako lek antyagregacyjny); L-826266	[46, 52, 110]
α _{2A} [receptor adrenergiczny] (RODZINA RODOPSYNY/PODGRUPA AMINOWA)	OUN; śledziona; nerki; aorta; płuca; mięśnie szkieletowe; serce; wątroba; śródbłonek	hamowanie presynaptyczne uwalniania NA z zakończeń nerwowych; spadek ciśnienia krwi; sedacja; hipotermia; analgeza	noradrenalina, adrenalina (NA=A); klonidyna (częściowy agonista) oxymetazolina (selektywny agonista)	johimbina; BRL 44408; BRL 48962	[19, 63]
A ₁ [receptor adenylozyny] (RODZINA RODOPSYNY/PODGRUPA MECA)	centralny i obwodowy układ nerwowy; nadnercza; nerki; mięśnie szkieletowe; wątroba; adipocyty; oskrzela; trzustka; kości	hamowanie uwalniania neuroprzeźkaźników w synapsach (działanie uspokajające, przeciwpadaczkowe, neuroprotektoryjne); skurcz naczyń nerkowych oraz mięśniówki oskrzeli; blokowanie przewodnictwa przedsionkowo-komorowego w sercu i spadek siły skurczu; aktywacja osteoklastów; hamowanie lipolizy	hamowanie uwalniania neuroprzeźkaźników w synapsach (działanie uspokajające, przeciwpadaczkowe, neuroprotektoryjne); skurcz naczyń nerkowych oraz mięśniówki oskrzeli; blokowanie przewodnictwa przedsionkowo-komorowego w sercu i spadek siły skurczu; aktywacja osteoklastów; hamowanie lipolizy	metyloksantyny, np.: kofeina, teofilina (nieselektywne); roloflina (NAX); PSB 36; SLV 320	[33, 85]
CB1 i CB2 [receptory kanabinoidowe] (RODZINA RODOPSYNY/PODGRUPA MECA)	CB1: mózg i rdzeń kręgowy; układ sercowo-naczyniowy; hepatocyty i komórki endokryne trzustki; adipocyty; macica; tarczycza; nerki; mięśnie szkieletowe CB2: komórki immunologiczne i krwiotwórcze; płytki krwi; siatkówka; mikrogle; osteoblasty; osteoklasty	modulacja pamięci, emocji, aktywności motorycznej; termoregulacja; analgeza; hamowanie uwalniania neuroprzeźkaźników w synapsach; regulacja apetytu i metabolizmu; stymulacja lipogenezy w wątrobie; wzrost oporności na insulinę w mięśniach szkieletowych; wzrost aktywności lipazy lipoproteinowej w adipocytach; bradykardia; spadek ciśnienia krwi; regulacja gęstości kości; hamowanie agregacji płytek krwi i aktywności komórek immunologicznych	CB1 i CB2: endokanabinoidy (np. anandamid, 2-arachidonylglicerol (2-AG)); tetrahydrocannabinol (THC); CB1: arachidonylo-2'-chloroetanolamid (ACEA); CB2: AM1241	CB1: rimonabant; SR141716A; CB2: SR144528	[21, 22, 75, 79]

W komórkach ssaków występuje dziewięć membranowych izoform cykazy adenylowej (AC) oraz jedna rozpuszczalna (sAC, soluble AC). W tabeli 2 zebrano dostępne dane na temat rozmieszczenia i przypuszczalnej ich funkcji.

Izoformy enzymu związane z błoną komórkową są zbudowane podobnie: składają się z dwóch domen transmembranowych M₁ i M₂ oraz dwóch domen cytoplazmatycznych C₁ i C₂. Domeny C są podzielone na podjednostki C_{1a}, C_{1b}, C_{2a}, C_{2b}. Podjednostki C_{1a} i C_{2a} zawierają centra katalityczne reakcji syntezy cAMP, zaś region C_{1b} odgrywa rolę w regulacji funkcji enzymu. Główną rolę w aktywacji AC odgrywają podjednostki α_s białka G (α_s-krótka, α_s-długa, α_s-XL) [94]. Kompleks G_s-GTP łączy się z helisami α2' i α3' domeny C₂ i spina ją z domeną C₁ przez koniec aminowy. Zmiana konformacji zwiększa

aktywność wszystkich związanych z błoną komórkową izoform cykazy. Natomiast przedstawiciele rodziny G_i (G_{i1}, G_{i2}, G_{i3}, G₀ i G₂) hamują aktywność AC5 i 6, prawdopodobnie w wyniku rotacji domeny C₁ w przeciwnym kierunku niż czynią to białka G_s [45,94] (ryc. 2).

Istnieją także inne mechanizmy regulacji aktywności AC. Ca²⁺/kalmodulina (Ca²⁺-CaM) stymuluje AC1 przez połączenie z C_{1b}. Ca²⁺ związany z kalmoduliną aktywuje również izoformy 3 i 8, natomiast wolny kation hamuje AC5 i 6. Kinaza białkowa C aktywuje AC2 przez fosforylację Thr 1057 [45], a kinaza białkowa A hamuje pobudzoną izoformę 5 i 6 (regulacja zwrotna ujemna). Hamowanie każdej z izoform może zachodzić natomiast przez analogi adeninowe i adenylozyny (P-site inhibitors). Regulatorem aktywności cykazy są również dimery G_{βγ}, które mają zdolność pobudzania izoformy 2, 4 i 7 (działanie



Ryc. 2. Regulacja aktywności cykazy adenyloywej z udziałem białka G: - podjednostka α_s pobudza AC, co skutkuje wzrostem syntezy cAMP; - podjednostka α_i hamuje AC zmniejszając stężenie cAMP w komórce

Tabela 2. Dystrybucja tkankowa i funkcje izoform cykazy adenyloywej [82,97,105]

IZOFORMA AC	LOKALIZACJA TKANKOWA	DOMNIEMANA FUNKCJA
AC1	mózg; rdzeń kręgowy; nadnercza	proces uczenia, pamięć, plastyczność synaptyczna, nocycepcja
AC2	mózg; rdzeń kręgowy; serce; płuca; mięśnie	brak danych
AC3	mózg; serce; płuca; jądra; tkanka tłuszczowa brązowa; nabłonek węchowy	węch
AC4	mózg; serce; nerki; wątroba; płuca; macica; tkanka tłuszczowa brązowa	brak danych
AC5	mózg; rdzeń kręgowy; serce; nerki; wątroba; płuca; jądra; macica; nadnercza; tkanka tłuszczowa brązowa	nocycepcja (związana z receptorami opioidowymi μ i δ , ale nie κ), przekazywanie dopaminergiczne w mózgu; w sercu (przedsionki, tkanka przewodząca) związana z receptorem M2 (G $_i$)
AC6	mózg; rdzeń kręgowy; serce; płuca; jądra; tkanka tłuszczowa brązowa; nerki; wątroba; mięśnie; nadnercza	związana z receptorami β w kardiomiocytach, nasila kurczliwość mięśnia sercowego; rozkurcz oskrzeli
AC7	mózg; serce; płuca; jądra; nerki; wątroba; mięśnie	kontrola zachowania, nastroju
AC8	mózg; rdzeń kręgowy; płuca; jądra; serce; nadnercza; tkanka tłuszczowa brązowa; mięśnie; macica	proces uczenia, pamięć, nocycepcja (zahamowanie tej izoformy naśladuje działanie opioidów), plastyczność synaptyczna
AC9	mózg; płuca; mięśnie; rdzeń kręgowy; serce; nerki; wątroba; nadnercza	immunomodulacja, rozkurcz oskrzeli (stymulacja tej izoformy może przynieść korzyści terapeutyczne w leczeniu astmy)
sAC	jądra; mózg; serce; nerki; wątroba; mięśnie; drogi oddechowe; trzustka; kości; oczy; neutrofile	ruchliwość plemników; nasilenie glikolizy i produkcji mleczanów w astrocytach; tworzenie moczu; wydzielanie śluzu w drogach oddechowych; wydzielanie insuliny pobudzone podwyższonym stężeniem glukozy; mineralizacja kości; uwalnianie H $_2$ O $_2$ przez neutrofile

Tabela 3. Wybrane aktywatory i inhibitory cyklazy adenylowej

ZWIĄZEK	CHARAKTER ODDZIAŁYWANIA	SELEKTYWNOŚĆ	UWAGI	PIŚM.
forskolina	aktywator	wszystkie związane z błoną komórkową izoformy AC, z wyjątkiem AC9	stosowana w badaniach eksperymentalnych	[45,97]
kolforsyna	aktywator	AC5>AC2=AC3 (inne izoformy nie są zbadane)	rozpuszczalna pochodna forskoliny stosowana w Japonii w leczeniu ostrej niewydolności serca (Adehl, Nippon Kayakul)	[56,82]
HCO ³⁻	aktywator postaci rozpuszczalnych	sAC	źródłem wodorowęglanów może być środowisko zewnętrzne, płyny ustrojowe, oraz działanie anhidrazy węglanowej, przekształcającej CO ₂ w HCO ₃ ⁻	[105]
KH 7	inhibitor	specyficzny dla sAC (IC50: sAC<10 μM, a dla izoform związanych z błoną komórkową >> 100 μM)	stosowany w badaniach eksperymentalnych	[82]
NKY80	inhibitor	selektywny inhibitor AC5 (IC50: AC5=8,3 μM)	stosowany w badaniach eksperymentalnych	[82]
PMC-6	P-site inhibitor	selektywny inhibitor AC5 (IC50: AC5=0,32 μM)	stosowany w badaniach eksperymentalnych	[82]
HTS09836	P-site inhibitor	selektywny inhibitor AC1 (C50: AC1=8 μM)	stosowany w badaniach eksperymentalnych	[82]

synergistyczne w stosunku do G_s) oraz hamowania AC1 i 8 (silna inhibicja znosząca skutki działania G_s, forskoliny czy Ca²⁺-CaM). Dimery te aktywują również postaci rozpuszczalne cyklazy, które jak wiadomo, nie są wrażliwe na podjednostki α białka G [45,94]. Wśród substancji stymulujących AC najbardziej znana jest forskolina. Ten diterpen, wyekstrahowany z pokrzywy indyjskiej *Coleus forskohlii*, ma zdolność pobudzania wszystkich związanych z błoną komórkową izoform AC, z wyjątkiem AC9 oraz postaci rozpuszczalnych. Mechanizm działania tego związku polega na łączeniu domeny C₁ z C₂ dzięki oddziaływaniom wodorowym i hydrofobowym w miejscu wiążącym forskolinę. Izofорма 9 jest niewrażliwa na działanie tego diterpenu z powodu innych właściwości hydrofobowych miejsca wiążącego, wynikających z zamiany Ser na Ala oraz Leu na Tyr [45,94]. Forskolina, dzięki zdolności do pobudzania syntezy cAMP, wywołuje wiele zmian w organizmie ssaków, takich jak: obniżenie ciśnienia krwi, rozszerzenie naczyń krwionośnych i oskrzeli, zwiększenie siły skurczów mięśnia sercowego, regulacja metabolizmu (nasilenie cyklu Krebsa, hamowanie syntezy lipidów i pobudzenie lipolizy) oraz modulacja układu immunologicznego [5]. Z powodu słabej rozpuszczalności w wodzie oraz małej biodostępności, a także nieselektywnego działania wobec różnych izoform cyklazy adenylowej, forskolina nie jest powszechnie stosowana w leczeniu. Natomiast jej pochodna, rozpuszczalna postać – kolforsyna została wprowadzona do terapii ostrej niewydolności serca w Japonii [78]. Obecnie poszukiwane są związki selektywnie oddziału-

jące na poszczególne izoformy AC oraz charakteryzujące się takimi właściwościami farmakokinetycznymi, które zapewnią ich celowaną dystrybucję do tkanek efektorowych, co powinno ograniczyć występowanie działań niepożądanych. Z farmakologicznego punktu widzenia, obiecujące mogłyby być selektywne inhibitory izoformy AC5 w leczeniu bólu czy niewydolności serca oraz AC1 – w chorobach neurodegeneracyjnych [78]. Przykładowe aktywatory i inhibitory AC przedstawiono w tabeli 3.

Fosfodiesterazy

Fosfodiesterazy (PDE) kontrolują stężenie cAMP i cGMP przez degradację tych przekazników. Niektóre z nich są swoiste tylko dla cAMP (PDE4, 7, 8) lub cGMP (PDE5, 6, 9), inne mają zdolność hydrolizy obydwu nukleotydów. Wyróżnia się 11 rodzin PDE, których przedstawiciele różnią się nie tylko powinowactwem do substratów, ale także strukturą, miejscem występowania oraz mechanizmem regulacji (tabela 4).

Centra aktywne wszystkich PDE składają się z konserwatywnych reszt aminokwasowych. Badania nad trójwymiarową strukturą domeny katalitycznej PDE4B2B ujawniły, że składa się z 17 helis tworzących 3 subdomeny. Na styku subdomen występuje hydrofobowa kieszeń zawierająca dwa jony metali, która prawdopodobnie jest centrum aktywnym enzymu [113]. Ważną rolę w swoistości substratowej odgrywa reszta glutaminy Q817. W przypadku PDE hydrolizujących cAMP reszta ta

Tabela 4. Charakterystyka biochemiczna fosfodiesteraz ludzkich [69,76]

RODZINA PDE	GEN	EKSPRESJA TKANKOWA	SUBSTRAT (K_m [mm/l])	INHIBITORY	FUNKCJE	UWAGI
PDE1	PDE1A PDE1B PDE1C	mózg; mięśniówka gładka; serce; płuca; jądra	cAMP (73-120) cGMP (2,6-5) cAMP (10-24) cGMP (1,2-5,9) cAMP (0,3-1,2) cGMP (0,6-2,2)	nimodypina; IC86340; IC224; IC295; dioclein	PDE1A – regulacja kurczliwości mięśniówki naczyń i funkcji spermy; PDE1B – transmisja dopaminergiczna; wpływ na przeżycie i aktywność komórek immunologicznych; PDE1C – regulacja proliferacji mięśniówki gładkiej naczyń oraz funkcji neuronów i spermy	stymulowane kompleksem Ca^{2+} -CaM
PDE2	PDE2A	kora nadnerczy; mózg; serce; wątroba; płuca; płytki krwi; śródbłonek	cAMP (30-50) cGMP (10-30)	EHNA (inhibitor deaminazy adenozynowej); BAY-60-7750; DPD; IC933; oksindol; ND7001	regulacja metabolizmu, wydzielania aldosteronu, fosforylacji kanałów Ca^{2+} w sercu przez PKA i w neuronach przez cGMP; wpływ na pamięć długoterminową oraz funkcje barierowe śródbłonka w zapaleniu	stymulowana przez cGMP
PDE3	PDE3A PDE3B	serce; mięśniówka gładka; wątroba; płuca; adipocyty; płytki krwi	cAMP (0,02-0,15) cGMP (0,18)	pimobendan; amrinon; vesnarinon; milrinon; cilostazol; cilostamid; siguazodan	PDE3A – regulacja kurczliwości mięśnia sercowego, agregacji płytek krwi, skurczu mięśniówki gładkiej naczyń i drzewa oskrzelowego oraz wydzielania reniny; PDE3B – regulacja odpowiedzi komórek na insulinę, cyklu komórkowego, proliferacji, wydzielania insuliny	hamowane przez cGMP (inhibicja kompetycyjna)
PDE4	PDE4A PDE4B PDE4C PDE4D	mózg; komórki Sertolego; nerki; wątroba; serce; mięśniówka gładka; płuca; śródbłonek; immunocyty	cAMP (2,9-10)	roflumilast; rolipram; mezopram; cilomilast; piklamilast; NCS 613; etazolol	regulacja licznych procesów: koordynowanie funkcji neuronów; aktywacja monocytów i makrofagów; infiltracja neutrofilów; proliferacja mięśniówki gładkiej naczyń; płodność; kurczliwości serca i naczyń	specyficznie oddziałują z cAMP
PDE5	PDE5A	płuca; płytki krwi; mięśniówka gładka; mózg; serce; śródbłonek	cGMP (1-6,2)	sildenafil; tadalafil; wardenafil; zaprinast; DMPP0	regulacja mięśniówki gładkiej naczyń w płucach i prąciu, agregacji płytek krwi, funkcji neuronów	specyficznie oddziałuje z cGMP
PDE6	PDE6A PDE6B PDE6C	fotoreceptory; szyszynka; płuca	cGMP (15-17)	zaprinast; DMPP0; sildenafil; wardenafil	udział w transmisji sygnałów i fotoreakcji w oku; regulacja uwalniania melatoniny	fotoreceptor
PDE7	PDE7A PDE7B	mięśnie szkieletowe; komórki immunologiczne; mózg; serce; trzustka	cAMP (0,1-0,2)	BRL 50481; IC242; ASB16165	prawdopodobnie regulacja aktywacji komórek immunologicznych	niewrażliwe na rolipram
PDE8	PDE8A PDE8B	jądra; oczy; wątroba; mięśnie szkieletowe; serce; nerki; jajniki; mózg; tarczyca; komórki immunologiczne	cAMP (0,04-0,06)	PF-04957325	regulacja aktywacji limfocytów T oraz funkcji komórek Leydiga	niewrażliwe na rolipram i IBMX
PDE9	PDE9A	nerki; wątroba; płuca; mózg	cGMP (0,17-0,39)	BAY-73-6691; PF-04447943	regulacja funkcji neuronów	niewrażliwa na IBMX
PDE10	PDE10A	mózg; jądra; tarczyca	cAMP (0,26) cGMP (7,2)	papaweryna; TP-10, MP-10	regulacja funkcji neuronów w mózgu (proces uczenia i pamięć)	hamowana przez cAMP
PDE11	PDE11A	mięśnie szkieletowe; gruczoł stercza; przysadka; wątroba; płuca	cAMP (1,04-5,7) cGMP (0,52-4,2)	BC-11-38	potencjalna rola w regulacji funkcji spermy	specyficzna zarówno dla cAMP, jak i cGMP

ustawiona jest inaczej, niż w przypadku enzymów katalizujących rozkład cGMP. W izoenzymach o podwójnej swoistości reszta glutaminy ma dużą swobodę ruchu i może ustawiać się tak, aby pasować zarówno do cAMP, jak i cGMP [7]. Enzymy rodziny PDE1 mają dwa miejsca wiążące Ca^{2+} /kalmodulinę, której przyłączenie zwiększa szybkość hydrolizy cyklicznych mononukleotydów. PDE2 są allosterycznie stymulowane przez cGMP przyłączające się do domen GAF. Izoenzymy rodziny PDE3 mogą hydrolizować zarówno cAMP jak i cGMP, jednak *in vivo* cGMP hamuje ich zdolność rozkładu cAMP. Regulacja aktywności PDE3 zachodzi również w wyniku fosforylacji, w której uczestniczą kinazy proteinowe (PKA i PKB) [7,116]. Modułacja aktywności fosfodiesteraz jest ważnym kierunkiem w poszukiwaniu nowych leków. Jako pierwsze do leczenia wprowadzono ich nieselektywne inhibitory, jakimi są metyloksantyny (kofeina, teofilina, teobromina, aminofilina czy pentoksyfilina). Ich działanie wynika nie tylko z hamowania rozpadu cAMP i cGMP w komórkach, ale również z antagonistycznego oddziaływania wobec receptorów adenozynowych. Częsteczki tych leków wykazują zróżnicowane powinowactwo i siłę oddziaływania w stosunku do określonych rodzin fosfodiesteraz oraz receptorów adenozynowych, przez co mają odmienne właściwości farmakologiczne. Dla przykładu, teobromina jest stosowana w terapii przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc i astmy oskrzelowej, ponieważ rozszerza oskrzela, hamuje proces zapalny i wykazuje działanie przeciwkaszlowe, pentoksyfilina znalazła zastosowanie w poprawie jakości życia pacjentów cierpiących na chromanie przestankowe, z powodu jej korzystnego działania na plastyczność erytrocytów, hamowania agregacji płytek krwi i zwiększania przepływu w naczyniach włosowatych. Aktywny metabolit pentoksyfiliny znany pod nazwą lizofilina, będący podobnie jak lek macierzysty inhibitorem PDE jest od kilku lat testowany pod kątem zapobiegania i leczenia cukrzycy typu 1, ze względu na jego zdolność hamowania uwalniania IL-12 oraz aktywacji czynnika transkrypcyjnego STAT4 w komórkach β trzustki.

Następnym etapem poszukiwań nowych leków w grupie inhibitorów PDE była synteza związków selektywnie hamujących daną rodzinę tych enzymów, co miało zwiększyć skuteczność i bezpieczeństwo terapii. Do leczenia włączono selektywne inhibitory PDE3: amrinon (stosowany w USA i Chinach), wesnarinon i olprinon (stosowane w Japonii) oraz milrinon (zarejestrowany również w Polsce – Corotrope). Leki te mają największe powinowactwo do izoformy 3A, co odpowiada za ich działanie sercowo-naczyniowe: powodują rozkurcz naczyń krwionośnych oraz zwiększają kurczliwość mięśnia sercowego. Stosowane są w krótkotrwałym leczeniu niewydolności serca [69]. W badaniach na zwierzętach wykazano także korzystne działanie olprinonu w zespole aspiracji smółki [68]. Lek ten zapobiegał obrzękowi płuc, obniżał liczebność neutrofilów w płucach oraz zmniejszał nasilenie stresu oksydacyjnego. Innym lekiem wprowadzonym do leczenia, który hamuje aktywność PDE3 jest cilostazol. Znalazł zastosowanie w terapii chroma-

nia przestankowego. Cilostazol hamuje agregację płytek krwi oraz zwiększa przepływ w drobnych naczyniach krwionośnych. Ponadto w warunkach eksperymentalnych wykazywał działanie przeciwkaszlowe [69].

Najsilniejsze działanie przeciwzapalne mają związki hamujące PDE4. Warto zaznaczyć, że wszystkie fosfodiesterazy tej rodziny, z wyjątkiem podrodziny 4C, są obecne w komórkach immunologicznych, takich jak: limfocyty T i B, eozynofile, neutrofile i makrofagi oraz w śródbłonku. Przedstawicielem pierwszej generacji związków selektywnie hamujących tę rodzinę enzymów jest rolipram. Częsteczka ta, mimo korzystnego działania przeciwzapalnego, nie została wprowadzona do leczenia z powodu częstych nudności i wymiotów, które występowały po podaniu tego związku. Dlatego też opracowano inhibitory drugiej generacji, które wykazują podobne powinowactwo do obu miejsc wiążących na częsteczce PDE4, przez co nie wywołują działań niepożądanych. W tej grupie nowych związków znalazły się roflumilast i cilomilast. Pierwszy został zarejestrowany do stosowania w terapii przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. Wykazuje działanie przeciwzapalne podobne do teofiliny, ale nie bronchospazmolityczne, przy czym charakteryzuje się lepszym profilem bezpieczeństwa i nie wymaga monitorowania stężenia we krwi. Natomiast cilomilast był testowany w badaniach klinicznych (faza III), ale do tej pory nie został zarejestrowany [69]. Ważną rodziną fosfodiesteraz kontrolujących stężenie cAMP w komórkach immunologicznych są także PDE7. W badaniach *in vitro* wykazano przeciwzapalne działanie inhibitora PDE7, przez hamowanie aktywności monocytów, makrofagów oraz limfocytów $CD8^+$ [93]. Jednak w badaniach na zwierzętach obserwowano stosunkowo słabą ich aktywność farmakologiczną stosowanych w monoterapii i zaproponowano łączne podawanie inhibitorów PDE7 i PDE4, celem zwiększenia efektywności i bezpieczeństwa leczenia w wyniku stosowania mniejszych dawek [31]. Skuteczność łącznego podawania leków hamujących poszczególne rodziny PDE jest obecnie obiektem prowadzonych badań na całym świecie. Poszukiwane są tzw. podwójne inhibitory, a proponowane połączenia to: PDE3/4 oraz PDE4/7 [36].

EFEKTORY cAMP

Kinaza proteinowa A

Głównym wewnątrzkomórkowym efektem cAMP jest kinaza proteinowa A (PKA). Jest to enzym zbudowany z dwóch podjednostek katalitycznych (C) oraz z dwóch podjednostek regulatorowych (R). Wyróżnia się dwa izoenzymy: PKAI oraz PKAII. Wśród podjednostek katalizujących i regulatorowych obserwuje się dobrą heterogenność ($RI\alpha$, $RI\beta$, $RII\alpha$, $RII\beta$, $C\alpha$, $C\beta$, $C\gamma$). Co więcej, odkrywano nowe warianty splicingowe, co jeszcze bardziej pogłębia zróżnicowanie budowy podjednostek. Podjednostka katalityczna zawiera niewielką domenę przy końcu aminowym, zbudowaną głównie z β nitek, odpowiedzialną za przyłączanie ATP oraz dużą domenę

złożoną z helis, znajdującą się przy końcu karboksylowym, odpowiedzialną za wiązanie substratu białkowego. Jednostka regulatorowa ma dwa miejsca wiążące cAMP, domenę D/D wiążącą białka AKAP oraz miejsce wiążące podjednostkę katalityczną. Nieaktywna postać PKA występuje jako tetramer. Wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego cAMP powoduje dysocjację podjednostek katalitycznych i jednoczesne uaktywnienie enzymu. Białka kotwiczące kinazę A (AKAP) umiejscawiają PKA w pobliżu substratów enzymu, tworząc mikrodomeny sygnalizacji zależnej od cAMP. PKA może fosforylować białka zawierające motyw arginina-arginina-X-seryna/ treonina, gdzie X jest aminokwasem hydrofobowym. Reszta fosforowa jest przyłączana do seryny lub treoniny [97]. Lista białek regulowanych przez PKA jest bardzo długa i obejmuje kilka podstawowych grup, takich jak:

- enzymy uczestniczące w metabolizmie, np. lipaza hormonowrażliwa, syntaza glikogenu i kinaza fosforylaza,
- kanały potasowe, np. kanał potasowy zależny od ATP,
- kanały jonowe bramkowane ligandem, np. GABA, AMPA i NMDA,
- białka odpowiedzialne za apoptozę, np. Bad,
- histony, np. H1c i H3,
- regulatory transkrypcji, np. białko wiążące się z elementem odpowiedzi na cAMP (CREB), czynnik jądrowy κ B, czynnik jądrowy aktywowanych komórek T3,
- fosfolipazy,
- białka uczestniczące w ścieżce sygnałowej cAMP, np. receptor β_2 -adrenergiczny, receptor dopaminowy D1 oraz fosfodiesterazy PDE4D3 i PDE3B [92].

Dotąd poznano kilka aktywatorów i inhibitorów PKA, są to związki stosowane jedynie w badaniach eksperymentalnych. Do najważniejszych inhibitorów PKA należą: H89 i KT5720, które silnie i selektywnie hamują PKA, przyłączając się do jej podjednostki katalitycznej [70]. Aktywacja PKA może natomiast nastąpić pod wpływem analogów cAMP, np. 6-Bnz-cAMP [11].

Białka Epac

Oprócz PKA odkryto także inne efekторы cAMP, np. wymiennicze cGMP zależne od cAMP (Epac, the exchange protein activated by cAMP). Są to białka łączące się z cAMP i aktywujące małe GTPazy Rap1 i Rap2. Istnieją dwie izoformy Epac: Epac1 i Epac2. Obie mają N-końcowy fragment regulatorowy oraz C-końcowy region katalityczny. Białka Epac biorą udział w adhezji, regulacji połączeń międzykomórkowych, egzocytocie, proliferacji, apoptozie, ekspresji genów i fagocytocie. Epac i PKA mogą działać niezależnie lub synergistycznie stymulując pewne funkcje lub wywołując przeciwne działania w zależności od umiejscowienia i otoczenia wewnątrzkomórkowego [17]. W ostatnich latach otrzymano swoisty analog cAMP - 8-(4-chloro-fenyltio)-2'-O-metyloadnenozylo-3',5'-cykliczny monofosforan (8-pCPT-2'-O-Me-cAMP), który okazał się użytecznym narzędziem w badaniach nad Epac [9].

Kanały zależne od cAMP

cAMP ma również zdolność łączenia się z kanałami jonowymi bramkowanymi cyklicznymi nukleotydami (CGN) modulując ich funkcję. Białka te składają się z czterech podjednostek, które są kodowane przez sześć różnych genów: CNGA1, CNGA2, CNGA3, CNGA4, CNGB1 i CNGB3. Na przykład kanały w pręcikach siatkówki składają się z trzech podjednostek CNGA1 i jednej podjednostki CNGB1. Poza siatkówką, CGN występują także w węchowych neuronach receptorowych, mózgu, sercu, nerkach i gonadach. Mają zdolność reagowania zarówno z cAMP, jak i z cGMP, mogą się różnić jednak selektywnością ligandową. CGN przepuszczają nieselektywnie jony sodowe, potasowe, wapniowe i magnezowe. Wapń stymuluje kinazy zależne od Ca^{2+} -CaM i zwrótnie reguluje stężenie cAMP [88]. Ciekawą cechą CGN jest brak występowania zjawiska odwrażliwienia receptorów wobec stałej obecności liganda [55].

ROLA cAMP W ODPOWIEDZI ZAPALNEJ I NOCYCEPCJI

Zapalenie jest złożonym, dynamicznym i uporządkowanym procesem zachodzącym w żywych tkankach, w odpowiedzi na bodziec uszkodzający (zewnątrz- lub wewnątrzprochodny). Prowadzi do uruchomienia wrodzonych oraz nabytych mechanizmów odporności, których celem jest neutralizacja i usunięcie czynnika sprawczego i naprawa uszkodzonych tkanek. Przebieg procesu zapalnego zależy nie tylko od aktywności leukocytów, które kumulują się w miejscu uszkodzenia, ale również od działania innych komórek i tkanek, takich jak: płytki krwi, śródbłonek, fibroblasty, czy mikroglej.

Jak wykazują liczne badania, główną rolę w odporności wrodzonej oraz regulacji odporności nabytej odgrywa ścieżka sygnałowa receptora Toll-podobnego (TLR). Receptor TLR aktywowany przez ligand (LPS, lipopolisacharyd) przekazuje sygnał przez molekuły MyD88 oraz TRIF. Powoduje to aktywację czynników transkrypcyjnych NF- κ B oraz IRF3, co zwiększa transkrypcję cytokin prozapalnych (TNF- α , IL-6, IL-12). Natomiast IL-10 hamuje indukcję cytokin prozapalnych wywołaną przez LPS, z udziałem czynnika transkrypcyjnego STAT3. Czynniki, takie jak prostaglandyna E2, histamina, pozakomórkowy ATP, wazoaktywny peptyd jelitowy (VIP) oraz przysadkowy peptyd aktywujący cyklazę adenyloową (PACAP) zwiększają wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP i tym samym blokują odpowiedź na LPS. cAMP może zwiększać ekspresję IL-10, ale znane są też inne mechanizmy regulacji odpowiedzi zapalnej przez ten przekaznik. Wykazano, że wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP nasila ekspresję c-Fos, a stymulacja LPS zwiększa aktywność kinazy IKK β , która stabilizuje strukturę c-Fos. c-Fos blokuje przyłączenie się białka p65 (członka rodziny NF- κ B) do regionu promotorowego TNF- α hamując tym samym jej ekspresję [58]. Ponadto cAMP hamuje aktywację receptora TCR/CD3 na limfocytach T przez ścieżkę zależną od PKA. Odkryto, iż PKA aktywuje kinazę Csk, która blokuje aktywność kinazy Lck. Lck odpowiada za fosforylację łańcucha ζ obec-

nego w receptorze TCR/CD3 i tym samym aktywację limfocytów T [104]. W innej pracy wykazano supresyjne działanie cAMP na limfocyty T przez aktywację transkrypcji antygeny CTLA4 zależną od drogi cAMP/PKA/CREB. CTLA4 wiąże CD80 lub CD86 i w ten sposób blokuje sygnały stymulujące aktywność tych komórek immunologicznych. Prowadzi to do hamowania progresji cyklu komórkowego i wytwarzania IL-2 [62].

W badaniach *in vitro* prowadzonych na monocytach dodatek selektywnego aktywatora PKA (6-Bnz-cAMP) powodował blokowanie wydzielania TNF- α , IL-12 oraz chemokiny MIP-1 β [11]. Hamowanie wydzielania cytokin, a zwłaszcza TNF- α , dodatkowo zmniejszało przepuszczalność naczyń, która jest stwierdzana podczas zapalenia. Podobnie, w badaniach *in vivo* dowiedziono, że leki zwiększające stężenie cAMP, znacznie osłabiają indukowaną podaniem LPS przepuszczalność włośniczek [48].

Inne efekторы cAMP, jakim są białka Epac zdają się odgrywać rolę w hamowaniu wydzielania interferonu- β , regulacji adhezji przez integryny α L β 2 i α L β 4, sterowaniu procesem apoptozy limfocytów B, adhezji do fibronektyny oraz migracji monocytów [39]. Cykliczny AMP reguluje także proces fagocytozy. Dowiedziono, iż wzrost cAMP działa hamująco na fagocytozę zachodzącą przez receptory zmiatacze (scavenger receptors), receptory Fcy oraz zależne od opsoniny receptory dopełniacza. Badania ostatnich lat wykazują supresyjny wpływ cAMP na uwalnianie reaktywnych form tlenu w komórkach żernych, osłabiając ich zdolność do zabijania drobnoustrojów [91]. Makrofagi, w których doszło do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP w wyniku oddziaływania prostaglandyny PGE2 na receptory EP2 oraz EP4 (silniejsze pobudzenie AC) były niezdolne do fagocytozy bakterii szczepu *Clostridium sordelli* w badaniach *in vitro*. Zjawisko to prawdopodobnie jest odpowiedzialne za rozwój wstrząsu toksycznego u kobiet po porodzie, u których doszło do infekcji szczepem tej bakterii. Obecna w macicy kobiet ciężarnych PGE2 hamuje aktywność makrofagów, a więc pierwszą linię obrony przed tym drobnoustrojem [84]. Ponadto dowiedziono, że fosfokinaza PKA aktywowana cAMP bezpośrednio lub pośrednio (przez aktywację innej kinazy) nasila przeciwwzpalne działanie glikokortykosteroidów, zarówno w komórkach immunologicznych, jak i śródbłonku, mięśniówce gładkiej czy fibroblastach. Działanie to jest złożone i wynika m.in. ze wzrostu stabilności receptora glikokortykosteroidowego (GR) oraz z jego zwiększonej translokacji do jądra komórkowego wskutek fosforylacji seryny w części regulatorowej N-końca tego receptora. Prowadzi to do wzrostu wydajności transkrypcji białek przeciwwzpalnych. Zjawisko to jest powszechnie wykorzystywane w leczeniu astmy przez łączenie glikokortykosteroidów z β_2 -mimetykami, które zwiększają wewnątrzkomórkowe stężenie cAMP [99].

Jak wykazują badania, cAMP jest głównym przekaźnikiem w procesie nocycepcji, również w przebiegu

zapalenia. Zaobserwowano, że wzrost stężenia cAMP w neuronach zwiększa odczuwanie bólu, a leki obniżające poziom tego nukleotydu w komórkach nerwowych wykazują działanie analgetyczne [78]. Głównymi czynnikami aktywującymi cyklazę adenylową w neuronach obwodowych są prostaglandyny (w tym PGE2 przez receptor EP2 i EP4 czy PGI przez receptor IP), uwalniane w dużych ilościach w miejscu zapalenia. Badania wykazują, iż aktywacja receptorów związanych z białkiem G_s w zakończeniu pierwotnego włókna afferentnego, prowadzi do wzrostu pobudliwości tych neuronów, głównie w wyniku fosforylacji kanałów sodowych TTX-R I_{Na} czy kanałów jonowych bramkowanych ligandem TRPV1 przez PKA zależną od cAMP [8,27]. Ponadto przewodzenie sygnałów bólowych przez obwodowe komórki nerwowe nasila mechanizmy zależne od kinazy PKC, która zostaje pobudzona działaniem białek EPAC [44]. cAMP jest ważnym przekaźnikiem uczestniczącym nie tylko w transmisji bólu, ale również w powstawaniu i utrzymywaniu zjawiska nadwrażliwości bólowej. W rogach tylnych rdzenia kręgowego dochodzi do przekazania sygnału bólowego z neuronu obwodowego na neuron II rzędu. Wzrost stężenia cAMP w komórce nerwowej II rzędu aktywuje PKA, co pobudza (prawdopodobnie pośrednio przez fosfatazę STEP61) kinazę Fyn, która fosforyluje tyrozynę (Tyr 1472) w podjednostce GluN2B receptora NMDA, w wyniku czego dochodzi do odłączenia się białka AP-2 (odpowiedzialnego za internalizację receptora) i przyłączenia się receptorów do błony postsynaptycznej. Pojawienie się tych receptorów w błonie postsynaptycznej w rogach tylnych rdzenia kręgowego odpowiada za zjawisko hiperalgezji [115]. Tak więc leki przeciwbólowe, stosowane w bólu zapalnym to przede wszystkim związki obniżające stężenie cAMP w neuronach. Są to obwodowo działające niesteroidowe leki przeciwwzpalne (NSAIDs), które hamują wytwarzanie prostaglandyn (w tym najsilniej działającą PGE2) oraz opioidy, których receptory znajdują się zarówno w obwodowym, jak i centralnym układzie nerwowym, a których aktywacja hamuje aktywność cyklazy adenylowej (z udziałem białka G_i).

ROLA cAMP W APOPTOZIE KOMÓREK

Apoptoza to naturalny proces związany z programowaną śmiercią komórki w organizmach wielokomórkowych. Odgrywa także rolę w przebiegu procesów chorobowych, takich jak sepsa i wstrząs septyczny [53]. Zarówno w eksperymentalnych modelach sepsy u zwierząt, jak i u krytycznie chorych obserwowano zwiększoną apoptozę w organach limfatycznych i niektórych tkankach parenchymalnych. U pacjentów, którzy zmarli z powodu sepsy stwierdzono nasiloną apoptozę w śledzionie, węzłach limfatycznych, jelicie grubym i krętym [43]. Jak wiadomo, główną rolę w procesie apoptozy odgrywają proteazy cysteinowe, zwane kaspazami [47]. Wyniki badań ostatnich lat dowodzą, że spośród wielu czynników, także cAMP może brać udział w kontrolowaniu apoptozy [107]. Jeden z mechanizmów tego działania jest związany z peptydem podobnym do glukagonu-1 (GLP-1) wytwa-

rzany przez jelitowe komórki L, który działa przez receptor sprzężony z białkiem G. Badania mające na celu określenie wpływu GLP-1 na stres oksydacyjny i apoptozę w mikronaczyniowych komórkach śródbłonkowych serca w warunkach hiperglikemii wykazały, że analog GLP-1 działając hamująco na ekspresję Rho i ROCK (regulatorów stresu oksydacyjnego) przez mechanizm zależny od cAMP i PKA, obniżał poziom wolnych rodników w komórkach. Komórki hodowane w obecności analogu GLP-1 wykazywały mniejszy stopień apoptozy (badany metodą TUNEL) oraz cechowały się obniżoną ekspresją kaspazy-3 [107]. Miller i wsp. podjęli próbę wyjaśnienia mechanizmu hamowania apoptozy w komórkach kanalików zbiorczych nerek przez wazopresynę. W obecności 1-dezamino-8-D-arginino wazopresyny (dDAVP) markery apoptozy ulegały obniżeniu w mysiej linii komórek kanalików zbiorczych poddanych działaniu czynników proapoptotycznych (staurosporyny, aktynomycyny D i cykloheksymidu). Działanie zostało zablokowane przez dodatek antagonisty receptora V2. Inkubacja komórek z analogiem cAMP (8-cpt-cAMP) obniżyła poziom apoptozy, a dodatek selektywnego aktywatora EPAC doprowadził do wzrostu aktywnych kaspaz. Sugeruje to występowanie przeciw- i proapoptotycznego działania cAMP w tej samej komórce, przy czym nasilenie skutku przeciwapoptotycznego było znacznie większe. Wykazano, że wazopresyna hamuje apoptozę przez receptor V2, aktywację PKA i fosforylację Bad i Bok [66]. Aktywacja receptora β -adrenergicznego wywoływała apoptozę w komórkach mysiej linii chłoniaka T-limfatycznego S49 zależnie od białka G_s i PKA. Nadekspresja Bcl-2 niwelowała apoptozę zależną od cAMP w tych komórkach [114]. W komórkach linii ostrej białaczki limfoblastycznej (podtyp B komórkowy) forskolina hamowała proapoptotyczny wpływ promieniowania jonizującego przez obniżenie stężenia przeciwnowotworowego białka p53. Nie dochodziło do indukcji białek Puma i Bax, niezbędnych do aktywacji kaspaz [71]. Wyniki te nie znalazły potwierdzenia w badaniach innych autorów, które wskazują, że cAMP może podnosić poziom spontanicznej apoptozy i potęguje proapoptotyczny potencjał chlorambucylu w komórkach przewlekłej białaczki B-limfocytowej [64]. Nowo odkryty mechanizm stawia więc pod znakiem zapytania możliwość wprowadzeniem czynników indukujących cAMP w terapii przeciwnowotworowej [71]. W komórkach białaczkowych cAMP stymuluje białka HDAC i SIRT1, które utrzymują p53 w stanie hipoacetylacji. Ułatwia to interakcję p53 z ligazą ubikwitynową HDM2 i przyspiesza eliminację p53. Sugeruje się możliwość terapeutycznego zastosowania inhibitorów deacetylaz histonowych u chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną [56]. Najnowsze badania wykazały, iż resolwina D1 (mediator lipidowy syntezowany z kwasu dokozaheksaenowego, działający przez GPCR) hamuje apoptozę w makrofagach uczestniczących w przeciwbakteryjnej odpowiedzi zapalnej. Resolwina aktywuje PKA, co prowadzi do zahamowania oksydazy NADPH i wzrostu ekspresji białek Bcl-xl oraz Bcl-2, skutkując blokowaniem apoptozy [61]. W neutrofilach cAMP wykazuje działanie przeciwapoptotyczne niezależnie od

PKA [38]. Działanie cAMP przez PKA w większości przypadków przyspiesza proces apoptozy, zaś aktywacja Epac hamuje śmierć komórki. Nie jest to jednak sztywną regułą [47]. Selektywna aktywacja Epac blokuje apoptozę wywołaną TNF- α oraz cykloheksymidem i staurosporyną w ludzkich liniach monocytarnych [38], choć istnieją doniesienia o udziale tego białka w nasilaniu apoptozy. PKA również nie ma jednoznacznego działania proapoptotycznego. Odkryto, iż PKA może wpływać na aktywność kinazy Akt, powiązanej z dynaminą białka 1 oraz kinazy PI3, spowalniając tym samym śmierć komórki [47].

ROZMIESZCZENIE cAMP W KOMÓRCE – KONCEPCJA KOMPARTMENTALIZACJI

Jak już wspomniano, cAMP jest syntetyzowany przez związaną z błoną komórkową cyklazę adenylową po wpływie różnych związków, które mogą aktywować receptory sprzężone z białkiem G. Mimo to, że jest cząsteczką, która przenika przez błony biologiczne, jej dystrybucja wewnątrz komórki jest raczej ograniczona z powodu szybkiego rozkładu przez PDEs. Zaobserwowano, że pobudzenie wielu rodzajów receptorów GPCR prowadzi do podobnego wzrostu stężenia cAMP w komórce, lecz może wywoływać bardzo różne skutki. Okazuje się, że stężenia cAMP często różni się w poszczególnych przestrzeniach (kompartamentach) wewnątrzkomórkowych, co możliwe jest dzięki nierównomiernemu rozmieszczeniu białek odpowiadających za syntezę i rozkład tego przekaźnika. Szczególnie ważną rolę odgrywają tu PDEs, które nie dopuszczają do dyfuzji cAMP w miejsca niepożądane, tworząc pewnego rodzaju przestrzenny gradient stężeń cyklicznego AMP. Nierzadko enzymy regulujące stężenie cAMP oraz białka efektorowe położone są blisko siebie i formują kompleksy z udziałem białek kotwiczących [26].

Rozwój nowych technik mikroskopii fluorescencyjnej wykorzystującej zjawisko transferu energii rezonansu fluorescencyjnego (fluorescence resonance energy transfer - FRET) umożliwił obrazowanie gradientów stężeń cAMP oraz precyzyjne określenie umiejscowienia konkretnych białek wewnątrz żywej komórki. FRET to zjawisko występujące, gdy dwa fluorofory (zazwyczaj białka o fluorescencji cyjanowej i żółtej) są umiejscowione blisko siebie oraz gdy widmo emisji pierwszego fluoroforu pokrywa się z widmem absorpcji drugiego. Podczas pobudzenia pierwszego fluoroforu (donora) dochodzi do emisji charakterystycznej długości fali elektromagnetycznej. Fala pobudza drugi fluorofor (akceptor), co powoduje emisję akceptora. Zjawisko to można wykorzystać do badania zmian konformacyjnych białek oraz rozszczepienia holoenzymu na podjednostki [26]. Z użyciem tej techniki wykazano, iż pobudzenie receptorów β -adrenergicznych prowadziło do pojawienia się odrębnych mikrodomen o dużym stężeniu cAMP, aktywowanego PKA. Dodatek nieswoistego inhibitora PDEs zaburzył gradienty stężeń cAMP, co nasuwa przypuszczenie, iż PDEs odpowiadają za wyznaczenie granic przestrzennych „chmur” cyklicznego AMP [117].

Dzięki sondom FRET odkryto, iż PKAI i PKAII łączą się z odmiennymi białkami AKAP w różnych miejscach w komórce miocytu. Ponadto wykazano, że odmienne izoformy PDE uczestniczą w regulacji stężenia cAMP w pobliżu obu typów PKA. Stymulacja różnych receptorów GPCR może zmieniać stężenia cAMP w różnych kompartmentach komórki. Dla przykładu, działanie izoproterenolu na receptory β spowodowało powstawanie cAMP w kompartmentcie PKAII, podczas gdy stymulacja receptorów prostaglandynowych wywoływała wzrost cAMP w obszarach występowania PKAI [24].

W miocytach serca receptory β_1 oraz β_2 współdziałają z białkiem G_s , jednak ich selektywna stymulacja prowadzi do odmiennych odpowiedzi. Aktywacja receptora β_2 związana jest z fosforylacją białek kurczliwych przez PKA oraz może, w pewnych warunkach, prowadzić do przerostu mięśnia sercowego i apoptozy. Za pomocą technik wykorzystujących FRET ustalono, że receptory β_2 są umiejscowione w pobliżu tubuli poprzecznych miocytów. W komórkach pochodzących z serc szczurów cierpiących na przewlekłą niewydolność mięśnia sercowego zaobserwowano redystrybucję receptorów β_2 z tubul poprzecznych, co skutkowało szerszym i mniej ograniczonym przestrzennie wzrostem wewnątrzkomórkowego stężenia cAMP [72]. Swoiste dla mięśnia białko kotwiczące kinazę A (mAKAP) jest rusztowaniem dla kompleksu białek odpowiedzialnych za przekazywanie sygnału z receptora adrenergicznego w miocycie. mAKAP łączy się bezpośrednio z AC5, PKA, PDE4D3, receptorem rianodynowym oraz fosfatazami PP2B i PP2A tworząc układ regulujący stężenie cAMP na zasadzie sprzężenia zwrotnego ujemnego [25]. Odkryto wiele innych białek kotwiczących, które umiejscawiają PKA w pobliżu ich substratów. Białka Yotiao, AKAP15/18 δ oraz AKAP79/150 ułatwiają fosforylację odpowiednio kanału potasowego KCNQ1, fosfolambanu oraz kanałów wapniowych typu L [26].

Innym aspektem przestrzennej organizacji przekaźnictwa przez cAMP jest internalizacja receptorów GPCR. Okazuje się, że endocytoza receptora wcale nie musi się wiązać z przerwaniem jego funkcji. Receptor parathormonu (PTHrP) może być aktywowany przez parathormon (PTH) lub peptyd PTH-podobny (PTHrP). Po aktywacji przez PTH receptor ulega internalizacji, lecz dalej wysyła sygnał docierający w głąb komórki. Aktywacja przez PTHrP prowadzi do wzrostu cAMP jedynie przy powierzchni błony komórkowej [30]. Jak wykazano, różne izoformy Epac są umiejscowione w osobnych kompartmentach komórki: np. Epac1 znajduje się w pobliżu mitochondriów, Epac2A przy błonie cytoplazmatycznej, a Epac2B w cytosolu (opisano w [26]). Istotną rolę w przestrzennym umiejscowieniu Epac odgrywają białka ERM (ezrin/radixin/moesin) [10]. Wiele uwagi w ostatnich latach poświęca się wyjaśnieniu mechanizmu działania cAMP na przepuszczalność bariery śródbłonkowej płuc. Odkryto, iż cAMP działając poprzez Epac lub PKA w pobliżu błony komórkowej zwiększa integralność bariery, a przenikanie przekaźnika w głąb cytoplazmy

uruchamia mechanizmy zależne od PKA, które zmieniają układ mikrotubul, zwiększając przepuszczalność tej bariery [81].

ZEWNĄTRKOMÓRKOWA ŚCIEŻKA SYGNAŁOWA cAMP I JEGO TRANSPORT NA ZEWNĄTRZ KOMÓRKI

Wyniki badań przeprowadzonych na hodowlach tkankowych komórek mięśni szkieletowych szczura wskazują na istnienie ścieżki enzymatycznej odpowiedzialnej za pozakomórkowy rozkład cAMP [18]. Aktywacja AC za pomocą różnych stężeń forskoliny (1-300 mM) w obecności nieselektywnego inhibitora PDE - IBMX prowadziła do wzrostu stężenia pozakomórkowego cAMP proporcjonalnie do wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego tego nukleotydu po 30 min inkubacji. Stężenia pozakomórkowe wahały się w granicach 16,4-23,9% całkowitego stężenia cAMP. Jak wykazano, zewnątrzkomórkowy cAMP jest rozkładany za pomocą PDE znajdującej się po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Co więcej, powstający w wyniku tej reakcji 5'-AMP ulega dalszej przemianie do adenozy. Obecność zewnątrzkomórkowych PDE wykazano *in vitro* w wielu komórkach i tkankach, np.: w wątrobie, limfocytach, neuronach, adipocytach i komórkach nerkowych [18].

Dodatek inhibitora transporterów - probenecydu do hodowli tkankowych komórek mięśni szkieletowych powoduje zahamowanie zewnątrzkomórkowego wzrostu stężenia cAMP indukowanego obecnością izoprenaliny i forskoliny [18]. Jak wykazano, transport cAMP na zewnątrz komórki odbywa się z udziałem dwóch transporterów z rodziny MRP (multidrug resistance proteins) – MRP4 i 5 (ABCC4 i ABCC5) [87]. MRP4 transportuje ponadto PGE1 i PGE2, a transport ten ulega wysyceniu (K_M wynosi odpowiednio 3,2 i 3,4 M) i może ulec zahamowaniu pod wpływem m.in. indometacyny i ibuprofenu [82]. Zarówno MRP4, jak i MRP5 należą do rodziny ABC (ATP-binding cassette) i mogą transportować wiele substancji egzo- i endogennych wbrew gradientowi stężeń, dzięki energii uzyskanej z hydrolizy ATP. Badania wykazały, że transportery te mają także znaczne powinowactwo do cGMP [49,60,103]. Występują w wielu narządach i tkankach, przy czym MRP5 nie występuje w oku. Największą ekspresję MRP4 obserwowano w nerce i sterczu, nieco mniejszą w wątrobie, jądrach, jajnikach, płucach, nadnerczach, neuronach i komórkach krwi, takich jak: ludzkie erytrocyty, płytki krwi i limfocyty [74]. Zjawisko aktywnego transportu cAMP z komórki pod wpływem np. stymulacji hormonalnej obserwowano w wielu badaniach *in vitro*. Na przykład dodatek glukagonu do perfuzatu wątroby szczura, czy podanie parathormonu w postaci wlewu dożylnego zdrowym osobnikom powodowały wzrost stężenia cAMP odpowiednio w perfuzacji i moczu badanych osobników [87]. Podanie parathormonu w większej dawce (40 mU/kg m.c./min) prowadziło do niewielkiego wzrostu cAMP także w osoczu. Podobny skutek występował w komórkach zwoju szynowego, perfundowanym sercu, komórkach tłuszczowych i retikulocytach w obecności agonisty receptora β [87].

cAMP jako marker odpowiedzi na lek

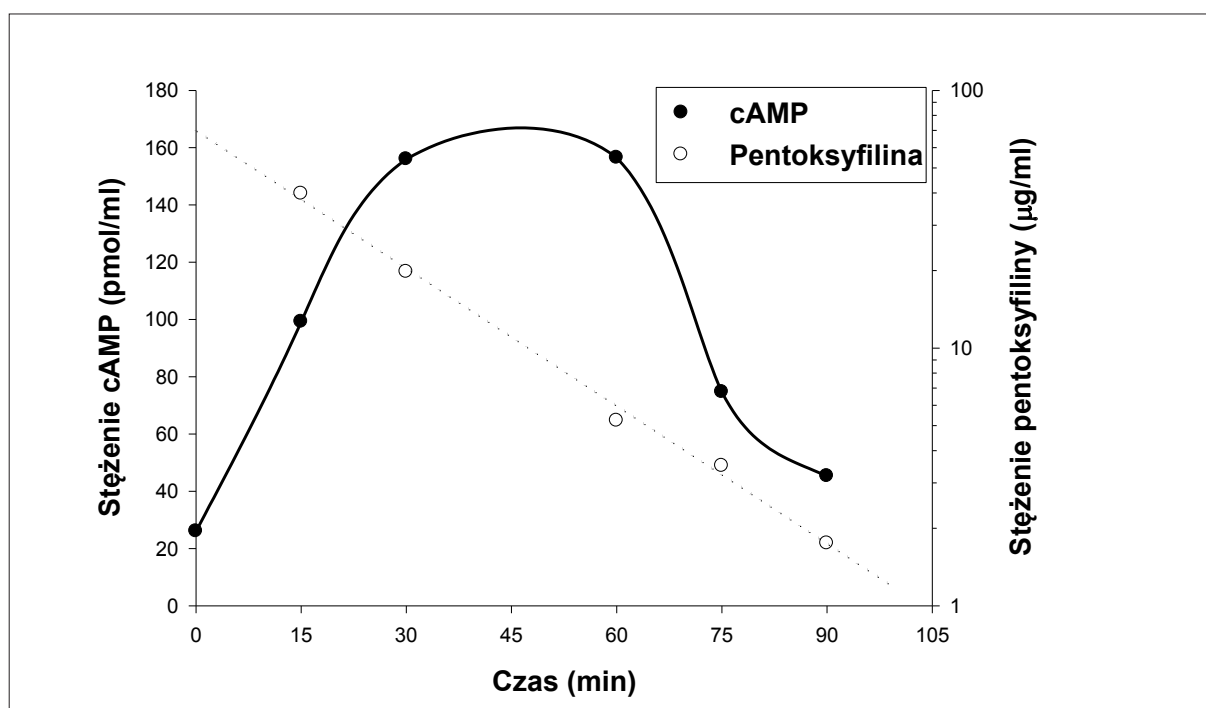
Wyniki badań dowodzą, że po podaniu leków modulujących poziom cyklicznego AMP, stężenie tego nukleotydu ulega zmianom we krwi i/lub tkankach zwierząt. Dla przykładu, po podaniu nowego inhibitora PDE4, CP-80,633 myszom drogą dożyłkową stwierdzono istotny, zależny od dawki wzrost stężenia cAMP w osoczu w krótkim czasie. Ponadto u myszy z indukowaną podanym dootrzewnowo LPS sepsą, CP-80,633 hamował syntezę TNF- α , a działanie to również nasilało się wraz ze wzrostem dawki [16]. Natomiast po podaniu kortykosteroidu szczurom obserwowano wzrost stężenia cAMP w wątrobie [51]. Autorzy tej pracy, testując różne modele farmakokinetyczno-farmakodynamiczne wykazali, że wzrost stężenia cAMP w tkance wątrobowej jest wynikiem hamującego działania kompleksu lek-receptor w jądrze komórkowym na proces degradacji cAMP. Po podaniu dożylnie jednorazowej dawki 10 i 50 mg/kg metyloprednizolonu obserwowano wzrost stężenia tego nukleotydu odpowiednio z 654 do 883 oraz z 656 do 951 pmol/g wątroby. Stężenie maksymalne cAMP obserwowano 6 h od chwili podania kortykosteroidu. Podczas podawania metyloprednizolonu w postaci wlewu ze stałą szybkością 0,1 i 0,3 mg/kg/h za pomocą wszczepionych podskórnie pomp osmotycznych, w ciągu 24 h stężenie cAMP wzrosło z 278 do 2671 i 2716 pmol/g wątroby po podaniu odpowiednio niskiej i wysokiej dawki leku. Po kilku dniach trwania wlewu obserwowano obniżenie stężenia cAMP, co może wskazywać na wystąpienie zjawiska tolerancji na podawany lek.

Wyniki wstępnych badań prowadzonych w naszym laboratorium wskazują, że stężenia cAMP mogą wzrastać pod

wpływem leków modulujących poziom tego nukleotydu tylko w wybranych tkankach. Na przykład po podaniu dożylnie nieselektywnego inhibitora fosfodiesterazy – pentoksyfiliny szczurom w dawce 80 mg/kg obserwowano istotny wzrost stężenia cAMP w osoczu w krótkim czasie, tj. po 15 min od chwili podania leku, a stężenie maksymalne występowało między 30 a 60 min (ryc. 3).

Natomiast zmiany w stężeniach cAMP w wątrobie, nerce i płucach po upływie 1 i 4 h od chwili podania badanego leku były znacznie mniejsze. Podana w tej samej dawce cyprofloksacyna spowodowała ponad trzykrotny wzrost stężenia tego nukleotydu, ale tylko w płucach zwierząt [wyniki nieopublikowanych badań własnych]. Obserwowany wzrost cAMP w płucach po podaniu cyprofloksacyny był prawdopodobnie spowodowany aktywacją receptora EP2, którego ekspresja w tym narządzie jest wysoka.

Jak już wspomniano, cykliczny AMP może hamować ekspresję prozapalnych cytokin, m.in. przez czynnik transkrypcyjny NF- κ B [67]. Istnieją doniesienia, które dowodzą, że występuje korelacja między hamowaniem aktywności PDE a supresją wytwarzania TNF- α po stymulacji LPS komórek jednojądrzastych otrzymanych z krwi zdrowych ochotników. W badaniach tych wykazano liniową zależność między wartościami IC_{50} dla hamowania PDE i TNF- α w obecności inhibitorów PDEs, pochodnych 3,7-dimetyloksantyny, takich jak: pentoksyfilina, jej hydroksylowa pochodna - lizofilina oraz wybranych pochodnych 3-metyloksantyny [90]. Wyniki wcześniejszych badań przeprowadzonych w naszym laboratorium wykazały, że pentoksyfilina i lizofilina w sposób zależny



Ryc. 3. Zmiany stężenia cAMP i pentoksyfiliny w osoczu szczura po dożylnym podaniu pentoksyfiliny w dawce 80 mg/kg m.c.

od dawki obniżały stężenia TNF- α u myszy z indukowaną LPS endotoksemią w surowicy [111] i, w mniejszym stopniu, tkankach badanych zwierząt [112]. Może to dowodzić, że jednym z głównych mechanizmów działania przeciwzapalnego pochodnych metyloksantyny jest zwiększenie stężenia cAMP w tkance.

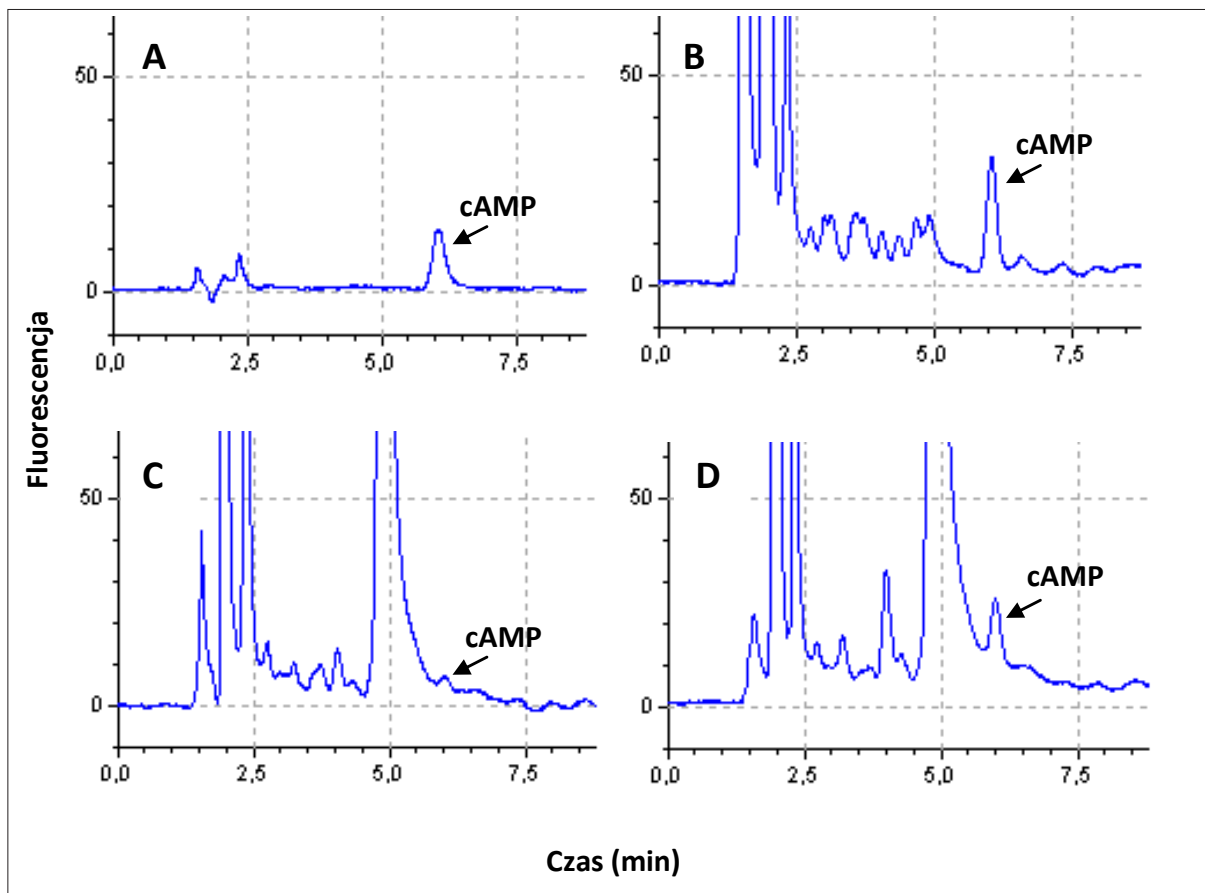
Podobne obserwacje odnoszą się do leków będących agonistami GPCRs [29]. Po podaniu adrenaliny we wlewie kroplowym trwającym 30 min zaobserwowano wzrost stężenia cAMP w osoczu pacjentów chirurgicznych i zdrowych ochotników już po 20 min od rozpoczęcia wlewu. Obserwowane działanie może wynikać z pobudzenia receptorów β_2 -adrenergicznych obecnych w różnych narządach i tkankach (tabela 1) oraz na powierzchni komórek krwi, takich jak: eryocyty (a zwłaszcza retikuloocyty), leukocyty, limfocyty T i B oraz makrofagi. Inne receptory sprzężone z białkiem G_s , czyli pobudzające cyklazę adenylową, które występują na powierzchni elementów morfotycznych to m.in.: receptory EP2 i EP4, adenyzynowe A_{2A} , czy receptor IP [32,85].

Jak omówiono wcześniej, wiele inhibitorów PDE było lub jest obecnie testowanych w badaniach przedklinicznych lub klinicznych pod kątem leczenia chorób o podłożu zapalnym. W tego typu badaniach istnieje potrzeba

poszukiwania markerów odpowiedzi, które będą zmieniać swoje stężenia wraz z dawką badanego związku i korelować z działaniem klinicznym. Najczęściej stosowanymi markerami odpowiedzi po podaniu związków o działaniu przeciwzapalnym były: TNF- α , IL-6 lub tlenek azotu [15,37,111]. Ze względu na to, że pojawiają się z pewnym opóźnieniem we krwi w stosunku do zadziałania bodźca, ich stężenia obserwowane np. w eksperymentalnej sepsie różnią się znacznie międzygatunkowo oraz u różnych osobników tego samego gatunku, a koszt analizy tych markerów jest wysoki, są rzadko stosowane przez autorów prac z zakresu analizy farmakokinetyczno-farmakodynamicznej i przemysł farmaceutyczny. Istnieje więc potrzeba poszukiwania nowych biomarkerów, które w sposób zależny od dawki będą korelować z obserwowanym działaniem farmakologicznym. cAMP wydaje się doskonałym kandydatem na taki marker dla związków, których mechanizm działania jest związany ze wzrostem stężenia cAMP na różnych drogach, także ze względu na dostępność wielu metod analitycznych, które mogą być stosowane do oznaczenia stężeń tego nukleotydu w materiale biologicznym.

METODY OZNACZANIA cAMP W MATERIALE BIOLOGICZNYM

Jak wiadomo, wybór optymalnej metody analitycznej jest podstawowym etapem w badaniach farmakokine-



Ryc. 4. Chromatogramy roztworu cAMP o stężeniu 50 pmol/ml w wodzie (A), surowicy szczura po dodaniu cAMP w stężeniu 100 pmol/ml (B) surowicy szczura bez obecności leków (C) oraz 30 min po dożylnym podaniu pentoksyfiliny w dawce 40 mg/kg (D)

tyczno-farmakodynamicznych, zapewniającym uzyskanie precyzyjnych i rzetelnych wyników. W przypadku oznaczania cAMP w materiale biologicznym największe znaczenie mają obecnie: wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) z detekcją fluorymetryczną lub spektrofotometryczną, metody immunoenzymatyczne (EIA, enzyme immuno assay), wśród których najszerzej stosowane są testy ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) oraz metody radioimmunologiczne (RIA, radioimmuno assay). W tabeli 5 przedstawiono najważniejsze metody oznaczania stężeń cAMP w materiale biologicznym.

Istotą detekcji fluorescencyjnej jest pomiar intensywności emisji światła o określonej długości fali, emitowanego przez wykrywany związek w wyniku jego wzbudzenia światłem o wyższej energii niż światło emitowane. Jednak większość związków, w tym cAMP, nie wykazuje naturalnej fluorescencji i warunkiem analizy ich stężeń tą metodą jest ich derywatywacja. Proces opiera się na przeprowadzeniu związku, w następstwie reakcji chemicznej, w określone pochodne o swoistych właściwościach, umożliwiających ich oznaczenie. Najczęściej stosowaną metodą derywatywacji cAMP jest jego reakcja z 2-chloroacetaldehydem w buforze octanowym. Metoda była stosowana do oznaczeń cAMP w materiale ludzkim (osocze, sperma), zwierzęcym (osocze: psów, kotów, świńek morskich, szczurów, królików; hipokamp świńek morskich; mózg szarańczy wędrowniej *Locusta migratoria*) oraz roślinnym (kultury rzęsy *Lemna paucicostata*) [35,54,108,118,119]. Reakcję przeprowadza się w określonych warunkach czasu i temperatury derywatywacji, a powstająca pochodna cAMP, 1,N⁶-eteno-cykliczny-

-cAMP, jest oznaczana fluorymetrycznie przy długości fali wzbudzenia wynoszącej 280 nm i długości fali emisji równej 380, 400 lub 420 nm [35,54,118,119]. Na rycinie 4 przedstawiono przykładowe chromatogramy cAMP uzyskane w naszym laboratorium z wykorzystaniem techniki HPLC z detekcją fluorymetryczną oraz derywatywacją z użyciem 2-chloroacetaldehydu.

Ze względu na to, że reakcja derywatywacji cAMP może nie przebiegać w sposób ilościowy, niektórzy autorzy stosowali standard wewnętrzny, którym najczęściej była etenoadenozyna [119] lub widarabina [54]. Reakcja derywatywacji z użyciem 2-chloroacetaldehydu w buforze octanowym może znaleźć również zastosowanie do oznaczania innych pochodnych 6-amino nukleotydów lub nukleozydów w materiale biologicznym, takich jak: adenozyna, adenina, ATP, ADP lub AMP. Niekiedy do oznaczania cAMP wykorzystuje się również inne, mniej popularne odczynniki derywatywujące, jak np. bromoacetaldehyd [35,108].

Metoda oznaczania cAMP z wykorzystaniem techniki HPLC z detekcją fluorymetryczną nie jest jedyną, która znalazła zastosowanie w badaniach nad tym nukleotydem. W niektórych pracach stosowano metodę HPLC z detekcją UV. Okazało się jednak, że ten typ detekcji wymaga użycia większej ilości materiału biologicznego i charakteryzuje się czułością około 50 razy mniejszą niż w przypadku wykorzystania detektora fluorymetrycznego [6,42]. Analizując dane literaturowe można napotkać także kilka prac poświęconych zastosowaniu metody HPLC z detekcją masową (HPLC/MS) lub układem tandemowym (HPLC/MS/MS) do analizy

Tabela 5. Porównanie metod oznaczania stężeń cAMP w materiale biologicznym

METODA	ZALETY	WADY
HPLC z detekcją fluorymetryczną	Dostateczna czułość i swoistość metody, krótki czas trwania analizy, niższy koszt oznaczeń niż w przypadku RIA lub EIA, prostota przygotowania próbek do badań, brak konieczności użycia radioizotopów lub specyficznych przeciwciał, możliwość zastosowania do różnego rodzaju materiału biologicznego.	Możliwość interferencji innych związków obecnych w matrycy próbek, specyficzność wobec cAMP niższa niż w przypadku EIA czy RIA, konieczność przeprowadzenia oznaczanego związku w fluorescencyjną pochodną, wymagana większa ilość materiału biologicznego do badań niż w przypadku EIA.
HPLC z detekcją UV	Niższy koszt niż w przypadku RIA lub EIA, prostota przygotowania próbek do badań, brak konieczności użycia radioizotopów lub specyficznych przeciwciał, możliwość wykorzystania do różnego rodzaju materiału biologicznego.	Możliwość interferencji innych związków obecnych w matrycy próbek, specyficzność wobec cAMP niższa niż w przypadku EIA i RIA, 50 razy mniejsza czułość niż w przypadku detekcji fluorymetrycznej, konieczna większa ilość materiału biologicznego w porównaniu z EIA.
EIA/ELISA (metody immunoenzymatyczne)	Krótki czas analizy, możliwość przeprowadzenia analizy 96 lub 480 próbek równocześnie, wyższa czułość i specyficzność niż w przypadku HPLC z detekcją fluorymetryczną lub UV, wymagana niewielka objętość materiału biologicznego, możliwość wykorzystania testu do różnego rodzaju materiału biologicznego.	Wysoki koszt testów, konieczność przeprowadzenia procedury acetylacji cAMP w przypadku stężeń cAMP poniżej 5 pmol/ml, często wymagane wcześniejsze rozcieńczenie próbki.
RIA (metoda radioimmunologiczna)	Czułość i specyficzność porównywalna z EIA, wymagana niewielka objętość materiału biologicznego, możliwość przeprowadzenia analizy 100 próbek w ramach jednego testu, acetylacja cAMP dodatkowo zwiększa czułość metody.	Wysoki koszt analizy (wynikający przede wszystkim z konieczności wykorzystania radioizotopów), dłuższy czas trwania analizy w porównaniu z EIA, skomplikowana metodyka przygotowania próbek do badań, metoda nie może być zastosowana do każdego rodzaju materiału biologicznego.

Tabela 6. Komercyjne testy EIA/ELISA do oznaczania cAMP

PRODUCENT	MATERIAŁ BIOLOGICZNY	ZAKRES LINIOWOŚCI	CZUŁOŚĆ METODY	DETEKCJA	PIŚM.
Abcam™	surowica, osocze, mocz, płyny biologiczne, ekstrakty tkanek, lizat komórkowy	0,02-2 mM	>0,02mM	kolorymetryczna	[12]
Abnova™	osocze, mocz, ślina, lizaty komórek i tkanek	0-150 pmol/ml	-	kolorymetryczna	[14]
Cell Biolabs, INC™	osocze, mocz, lizaty komórek i tkanek	1-1000 pmol/ml (nieacetylowany cAMP); 10-2500 fmol/ml (acetylowany cAMP)	>1 pmol/ml	kolorymetryczna, chemiluminescencyjna	[28]
Enzo® Life Science	surowica, ślina, mocz, tkanki	0,78-200 pmol/ml (nieacetylowany cAMP); 0,078-20 pmol/ml (acetylowany cAMP)	-	kolorymetryczna	[65]
Merck Milipore	komórki	0,156-10 ng/ml	<0,025 ng/ml	kolorymetryczna	[80]
c-AMP Screen®	lizaty komórek	0,06-6 pmol/ml	60 fmol/ml	chemiluminescencyjna	[98]
R&D Systems	supernatanty hodowli komórkowych, lizaty komórek, surowica, osocze, mocz	3,75-240 pmol/ml	8,57 pmol/ml	kolorymetryczna	[101]
Thermo Scientific	supernatanty hodowli komórkowych, lizaty komórek, homogenaty tkanek	0,78 – 200 pmol/ml (nieacetylowany cAMP); 0,08 – 20 pmol/ml (acetylowany cAMP)	0,39 pmol/ml (nieacetylowany cAMP); 0,04 pmol/ml (acetylowany cAMP)	kolorymetryczna	[120]

i identyfikacji cAMP [73,118]. W metodach tych często wykorzystuje się dimetylo-L-homoargininę (DMHA) lub sól tetraalkiloamonową jako odczynniki par jonowych. Co więcej, próby z wykorzystaniem ujemnej i dodatniej jonizacji wskazały, że ujemna jonizacja jest bardziej odpowiednia do oznaczania cAMP. Okazało się jednak, że uzyskane tymi metodami wartości limitu oznaczalności nie były niższe od wartości uzyskanej metodą HPLC z detekcją fluorymetryczną [118].

Do szybkiego ilościowego oznaczania cAMP można również zastosować metody immunoenzymatyczne, które mogą być wykorzystane dla każdego rodzaju materiału biologicznego. Testy immunoenzymatyczne do oznaczania cAMP, dostępne komercyjnie, są produkowane przez kilka firm (tabela 6). Ich zasada działania jest podobna i można ją przedstawić na przykładzie zestawu firmy Cell Biolabs [14].

W tym zestawie dołek płytki reakcyjnej jest opłaszczony poliklonalnym przeciwciałem antykróliczym. W środowisku reakcji są obecne królicze przeciwciała anty-cAMP, cAMP znakowane enzymem oraz wolne cAMP pochodzące z próbki badanej. cAMP znakowane konkuruje o ograniczoną liczbę miejsc wiążących na przeciwciałach anty-cAMP z wolnym cAMP. Kompleksy „wolne cAMP + przeciwciało anty-cAMP” oraz „znakowane cAMP + anty-cAMP” wiążą się z przeciwciałem antykróliczym w dołku. Po odpłukaniu kompleksów niezwiązanych, dodaje się substratu, który zostaje przekształcony przez enzym w produkt oznaczany luminometrycznie.

Im więcej wolnego cAMP znajduje się w badanej próbce, tym silniej wypierane jest znakowane enzymatycznie cAMP, czego skutkiem jest proporcjonalny do stężenia wolnego nukleotydu spadek luminescencji. W zależności od producenta, enzymy wykorzystywane w tej metodzie to: peroksydaza chrzanowa, fosfataza alkaliczna albo acetylocholinoesteraza (AChE), przy czym ten ostatni jest uważany za enzym o najlepszych właściwościach w tego typu testach. W porównaniu z peroksydazą chrzanową, AChE nie ulega samoistnej dezaktywacji w czasie analizy, jest stabilna w zakresie pH 5-10, a jej aktywność nie jest hamowana przez powszechnie stosowane bufory i konserwanty. Dzięki znacznej stabilności AChE, nie ma potrzeby stosowania odczynników hamujących reakcję, a pomiar absorbancji nie musi być wykonany natychmiast po skończeniu analizy. Wśród zalet metod immunoenzymatycznych należy zwrócić uwagę na stosunkowo krótki czas analizy (3-4 h), przy możliwości przeprowadzenia oznaczeń w 96 lub nawet 480 próbkach jednocześnie. Metody charakteryzują się również największą czułością i swoistością spośród wszystkich opisanych metod oznaczania cAMP. Ich wykorzystanie jest ograniczone jedynie wysoką ceną dostępnych komercyjnie zestawów.

Do ilościowego oznaczania cAMP stosuje się niekiedy metodę radioimmunologiczną (RIA). Wśród producentów testów RIA można wymienić: Immuno-Biological Laboratories™, Institutes of Isotopes lub PerkinElmer®. Testy RIA mogą być wykorzystane do oznaczania cAMP w moczu i osoczu, zawiesinach komórkowych, a obję-

tość próbki potrzebna do analizy wynosi, w zależności od producenta, 20-100 µl. Jak zapewniają producenci, w przyszłości metoda będzie mogła być wykorzystywana do oznaczania cAMP w każdym materiale biologicznym. Porównanie metody HPLC z detekcją fluorymetryczną z metodą RIA wykorzystującą konwersję α -[^{32}P]-ATP do ^{32}P -cAMP wykazało, że obydwie metody charakteryzują się porównywalną czułością [108].

PODSUMOWANIE

Jak wynika z przeglądu danych literaturowych, rola cAMP w wielu procesach fizjologicznych i patofizjologicznych nie została jeszcze do końca poznana. Wciąż nie wyjaśniono funkcji niektórych receptorów GPCR, nie wszystko wiadomo na temat udziału cAMP w modulacji apoptozy w wielu komórkach. Rozwój biologii molekularnej i związanych z nią technik, jak również pojawienie się nowoczesnych, bardzo czułych metod analitycznych pozwalają na uzyskiwanie coraz więcej informacji o tej ciekawej cząsteczce. Między innymi stało się możliwe poznanie skomplikowanego układu przestrzennego ele-

mentów ścieżki sygnałowej cAMP. Z roku na rok przybywa doniesień o nowych mechanizmach regulacji przekąźnictwa cAMP na niemal każdym etapie jego syntezy i działania. Koncepcja kompartmentalizacji cAMP, badania nad transporterami dla tego nukleotydu oraz pozakomórkową ścieżką degradacji cAMP, teorie na temat jego roli w procesie zapalnym i apoptozie, to tylko wybrane aspekty współczesnych badań nad tym wtórnym przekąźnikiem. W ostatnich latach bardzo ważnym kierunkiem w badaniach nad cAMP jest poszukiwanie selektywnych inhibitorów i aktywatorów enzymów zaangażowanych w syntezę i degradację cAMP. Związki te są testowane pod kątem ich zastosowania jako potencjalne leki o działaniu przeciwzapalnym, przeciwbólowym, sercowo-naczyniowym oraz w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Wiele nadziei budzą również efekторы cAMP jako potencjalne cele terapeutyczne nowych leków. Wzrost stężenia cAMP obserwowany we krwi po podaniu inhibitorów fosfodiesterazy wskazuje na możliwość zastosowania tej cząsteczki jako markera odpowiedzi na lek w badaniach farmakokinetyczno-farmakodynamicznych nad tymi związkami.

PIŚMIENICTWO

- [1] A randomized, 24-week, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study to evaluate the efficacy, safety and tolerability of ARIFLO® (15mg BID) in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). <http://www.gsk-clinicalstudyregister.com/study/CIL103657#ps> (07.01.2014)
- [2] A study of LY2409021 in participants with type 2 diabetes mellitus. <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02111096> (05.01.2015)
- [3] Abcam™ immunoassays products: cAMP ELISA. <http://www.abcam.com/camp-direct-immunoassay-kit-ab65355.html> (18.02.2014)
- [4] Abnova™ cAMP ELISA Kit. http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?Catalog_id=KA3388 (18.02.2014)
- [5] Alasbahi R.H., Melzig M.F.: *Plectranthus barbatus*: a review of phytochemistry, ethnobotanical uses and pharmacology - part 2. *Planta Med.*, 2010; 76: 753-765
- [6] Anderson F.S., Murphy R.C.: Isocratic separation of some purine nucleotide, nucleoside, and base metabolites from biological extracts by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 1976; 121: 251-262
- [7] Bender A.T., Beavo J.A.: Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev.*, 2006; 58: 488-520
- [8] Bhawe G., Zhu W., Wang H., Brasier D.J., Oxford G.S., Gereau R.W.IV: cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*, 2002; 35: 721-731
- [9] Bos J.L.: Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003; 4: 733-738
- [10] Bretscher A., Edwards K., Fehon R.G.: ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002; 3: 586-599
- [11] Bryn T., Mahic M., Enserink J.M., Schwede F., Aandahl E.M., Tassen K.: The cyclic AMP-Epac1-Rap1 pathway is dissociated from regulation of effector functions in monocytes but acquires immunoregulatory function in mature macrophages. *J. Immunol.*, 2006; 176: 7361-7370
- [12] c-AMP Screen® ELISA TEST Kit. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4412183> (18.02.2014)
- [13] Cabrera-Vera T.M., Vanhauwe J., Thomas T.O., Medkova M., Preininger A., Mazzone M.R., Hamm H.E.: Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.*, 2003; 24: 765-781
- [14] Cell Biolabs products: cyclic AMP assays. <http://www.cellbiolabs.com/cyclic-amp-assays> (18.02.2014)
- [15] Chakraborty A., Yeung S., Pyszczynski N.A., Jusko W.J.: Pharmacodynamic interactions between recombinant mouse interleukin-10 and prednisolone using a mouse endotoxemia model. *J. Pharm. Sci.*, 2005; 94: 590-603
- [16] Cheng J.B., Watson J.W., Pazoles C.J., Eskra J.D., Griffiths R.J., Cohan V.L., Turner C.R., Showell H.J., Pettipher E.R.: The phosphodiesterase type 4 (PDE4) inhibitor CP-80,633 elevates plasma cyclic AMP levels and decreases tumor necrosis factor- α (TNF α) production in mice: effect of adrenalectomy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997; 280: 621-626
- [17] Cheng X., Ji Z., Tsalkova T., Mei F.: Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 2008; 40: 651-662
- [18] Chiavegatti T., Costa V.L.Jr., Araujo M.S., Godinho R.O.: Skeletal muscle expresses the extracellular cyclic AMP-adenosine pathway. *Br. J. Pharmacol.*, 2008; 153: 1331-1340
- [19] Civantos Calzada B., Aleixandre de Artinano A.: Alpha-adrenoceptor subtypes. *Pharmacol. Res.*, 2001; 44: 195-208
- [20] Cook W.H., Lipkin D., Markham R.: The formation of a cyclic dihydrodiadenylic acid (I) by the alkaline degradation of adenosine-5'-triphosphoric acid (II). *J. Am. Chem. Soc.*, 1957; 79: 3607-3608
- [21] Crowe M.S., Nass S.R., Gabella K.M., Kinsey S.G.: The endocannabinoid system modulates stress, emotionality, and inflammation. *Brain Behav. Immun.*, 2014; 42: 1-5

- [22] Cunha P, Romao A.M., Mascarenhas-Melo F., Teixeira H.M., Reis F.: Endocannabinoid system in cardiovascular disorders-new pharmacotherapeutic opportunities. *J. Pharm. Bioallied. Sci.*, 2011; 3: 350-360
- [23] Daniel P.B., Walker W.H., Habener J.F.: Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu. Rev. Nutr.*, 1998; 18: 353-383
- [24] Di Benedetto G., Zoccarato A., Lissandron V., Terrin A., Li X., Houslay M.D., Baillie G.S., Zaccolo M.: Protein kinase A type I and type II define distinct intracellular signaling compartments. *Circ. Res.*, 2008; 103: 836-844
- [25] Dodge-Kafka K.L., Soughayer J., Pare G.C., Carlisle Michel J.J., Langeberg L.K., Kapiloff M.S. Scott J.D.: The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature*, 2005; 437: 574-578
- [26] Edwards H.V., Christian F., Baillie G.S.: cAMP: novel concepts in compartmentalised signalling. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2012; 23: 181-190
- [27] England S., Bevan S., Docherty R.J.: PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J. Physiol.*, 1996; 495: 429-440
- [28] Enzo® Life Sciences Products: cAMP ELISA Kit. [http://www.enzolifesciences.com/ADI-900-067/camp-eia-kit/\(18.02.2014\)](http://www.enzolifesciences.com/ADI-900-067/camp-eia-kit/(18.02.2014))
- [29] Ewaldsson C.A., Hahn R.G.: β 2-adrenergic responsiveness in vivo during abdominal surgery. *Br. J. Anaesth.*, 1998; 81: 343-347
- [30] Ferrandon S., Feinstein T.N., Castro M., Wang B., Bouley R., Potts J.T., Gardella T.J. Vilaradaga J.P.: Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat. Chem. Biol.*, 2009; 5: 734-742
- [31] Fortin M., D'Anjou H., Higgins M.E., Gougeon J., Aube P., Moktefi K., Mouissi S., Seguin S., Seguin R., Renzi P.M., Paquet L. Ferrari N.: A multi-target antisense approach against PDE4 and PDE7 reduces smoke-induced lung inflammation in mice. *Respir. Res.*, 2009; 10: 39
- [32] Foudi N., Gomez I., Benyahia C., Longrois D., Norel X.: Prostaglandin E2 receptor subtypes in human blood and vascular cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 2012; 695: 1-6
- [33] Fredholm B.B., IJzerman A.P., Jacobson K.A., Linden J., Muller C.E.: International union of basic and clinical pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - an update. *Pharmacol. Rev.*, 2011; 63: 1-34
- [34] Fredriksson R., Lagerstrom M.C., Lundin L.G., Schiöth H.B.: The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.*, 2003; 63: 1256-1272
- [35] Gangwani L., Tamot B.K., Khurana J.P., Maheshwari S.C.: Identification of 3',5'-cyclic AMP in axenic cultures of *Lemna paucicostata* by high-performance liquid chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991; 178: 1113-1119
- [36] Giembycz M.A.: Life after PDE4: overcoming adverse events with dual-specificity phosphodiesterase inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2005; 5: 238-244
- [37] Gozzi P., Pahlman I., Palmer L., Gronberg A., Persson S.: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the immunomodulating agent susalimod and experimentally induced tumor necrosis factor- α levels in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999; 291: 199-203
- [38] Grandoch M., Bujok V., Fleckenstein D., Schmidt M., Fischer J.W., Weber A.A.: Epac inhibits apoptosis of human leukocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 2009; 86: 847-849
- [39] Grandoch M., Roscioni S.S., Schmidt M.: The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function. *Br. J. Pharmacol.*, 2010; 159: 265-284
- [40] Harmar A.J., Fahrenkrug J., Gozes I., Laburthe M., May V., Pisegna J.R., Vaudry D., Vaudry H., Waschek J.A., Said S.I.: Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1. *Br. J. Pharmacol.*, 2012; 166: 4-17
- [41] Hata A.N., Breyer R.M.: Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol. Ther.*, 2004; 103: 147-166
- [42] Hoffman N.E., Liao J.C.: Reversed phase high performance liquid chromatographic separations of nucleotides in the presence of solvophobic ions. *Anal. Chem.*, 1977; 49: 2231-2234
- [43] Hotchkiss R.S., Swanson P.E., Freeman B.D., Tinsley K.W., Cobb J.P., Matuschak G.M., Buchman T.G. Karl I.E.: Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit. Care Med.*, 1999; 27: 1230-1251
- [44] Hucho T., Levine J.D.: Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron*, 2007; 55: 365-376
- [45] Hurley J.H.: Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 7599-7602
- [46] Ikeda-Matsuo Y., Tanji H., Narumiya S., Sasaki Y.: Inhibition of prostaglandin E2 EP3 receptors improves stroke injury via anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms. *J. Neuroimmunol.*, 2011; 238: 34-43
- [47] Insel P.A., Zhang L., Murray F., Yokouchi H., Zamboni A.C.: Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol.*, 2012; 204: 277-287
- [48] Irie K., Fujii E., Ishida H., Wada K., Suganuma T., Nishikori T., Yoshioka T. Muraki T.: Inhibitory effects of cyclic AMP elevating agents on lipopolysaccharide (LPS)-induced microvascular permeability change in mouse skin. *Br. J. Pharmacol.*, 2001; 133: 237-242
- [49] Jedlitschky G., Burchell B., Keppler D.: The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 30069-30074
- [50] Jiang J., Dingleline R.: Prostaglandin receptor EP2 in the crosshairs of anti-inflammation, anti-cancer, and neuroprotection. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2013; 34: 413-423
- [51] Jin J.Y., DuBois D.C., Almon R.R., Jusko W.J.: Receptor/gene-mediated pharmacodynamic effects of methylprednisolone on phosphoenolpyruvate carboxykinase regulation in rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2004; 309: 328-339
- [52] Jones R.L., Giembycz M.A., Woodward D.F.: Prostanoid receptor antagonists: development strategies and therapeutic applications. *Br. J. Pharmacol.*, 2009; 158: 104-145
- [53] Joshi V.D., Kalvakolanu D.V., Cross A.S.: Simultaneous activation of apoptosis and inflammation in pathogenesis of septic shock: a hypothesis. *FEBS Lett.*, 2003; 555: 180-184
- [54] Katayama M., Matsuda Y., Shimokawa K., Tanabe S., Kaneko S., Hara I., Sato H.: Simultaneous determination of six adenylyl purines in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence derivatization. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 2001; 760: 159-163
- [55] Kaupp U.B., Seifert R.: Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.*, 2002; 82: 769-824
- [56] Kloster M.M., Naderi E.H., Haaland I., Gjertsen B.T., Blomhoff H.K., Naderi S.: cAMP signalling inhibits p53 acetylation and apoptosis via HDAC and SIRT deacetylases. *Int. J. Oncol.*, 2013; 42: 1815-1821
- [57] Kobilka B.K.: G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007; 1768: 794-807
- [58] Koga K., Takaesu G., Yoshida R., Nakaya M., Kobayashi T., Kinjyo I., Yoshimura A.: Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein. *Immunity*, 2009; 30: 372-383

- [59] Kumar K., Sharma S., Kumar P., Deshmukh R.: Therapeutic potential of GABAB receptor ligands in drug addiction, anxiety, depression and other CNS disorders. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2013; 110: 174-184
- [60] Lai L., Tan T.M.: Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)-mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues. *Biochem. J.*, 2002; 361: 497-503
- [61] Lee H.N., Surh Y.J.: Resolvin D1-mediated NOX2 inactivation rescues macrophages undertaking efferocytosis from oxidative stress-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.*, 2013; 86: 759-769
- [62] Li J., Lin K.W., Murray F., Nakajima T., Zhao Y., Perkins D.L., Finn P.W.: Regulation of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 by cyclic AMP. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2013; 48: 63-70
- [63] Marino F., Cosentino M.: Adrenergic modulation of immune cells: an update. *Amino Acids*, 2013; 45: 55-71
- [64] Mentz F., Mossalayi M.D., Ouaz F., Baudet S., Issaly F., Ktorza S., Semichon M., Binet J.L., Merle-Beral H.: Theophylline synergizes with chlorambucil in inducing apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 1996; 88: 2172-2182
- [65] Merck Millipore Elisa Kit. http://www.merckmillipore.com/poland/life-science-research/creb-elisa-kit/EMD_BIO-CBA071/p_uLgb.s1O98sAAAEnlo85SfM4 (18.02.2014)
- [66] Miller R.L., Sandoval P.C., Pisitkun T., Knepper M.A., Hoffert J.D.: Vasopressin inhibits apoptosis in renal collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2013; 304: F177-F188
- [67] Minguet S., Huber M., Rosenkranz L., Schamel W.W., Reth M., Brummer T.: Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF- κ B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur. J. Immunol.*, 2005; 35: 31-41
- [68] Mokra D., Drgova A., Pullmann R.Sr., Calkovska A.: Selective phosphodiesterase 3 inhibitor olprinone attenuates meconium-induced oxidative lung injury. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2012; 25: 216-222
- [69] Mokry J., Mokra D.: Immunological aspects of phosphodiesterase inhibition in the respiratory system. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2013; 187: 11-17
- [70] Murray A.J.: Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci. Signal.*, 2008; 1: re4
- [71] Naderi E.H., Findley H.W., Ruud E., Blomhoff H.K., Naderi S.: Activation of cAMP signaling inhibits DNA damage-induced apoptosis in BCP-ALL cells through abrogation of p53 accumulation. *Blood*, 2009; 114: 608-618
- [72] Nikolaev V.O., Moshkov A., Lyon A.R., Miragoli M., Novak P., Paur H., Lohse M.J., Korchev Y.E., Harding S.E., Gorelik J.: β 2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science*, 2010; 327: 1653-1657
- [73] Oeckl P., Ferger B.: Simultaneous LC-MS/MS analysis of the biomarkers cAMP and cGMP in plasma, CSF and brain tissue. *J. Neurosci. Methods*, 2012; 203: 338-343
- [74] Oevermann L., Scheitz J., Starke K., Kock K., Kiefer T., Dolken G., Niessen J., Greinacher A., Siegmund W., Zygmunt M., Kroemer H.K., Jedlitschky G., Ritter C.A.: Hematopoietic stem cell differentiation affects expression and function of MRP4 (ABCC4), a transport protein for signaling molecules and drugs. *Int. J. Cancer*, 2009; 124: 2303-2311
- [75] O'Keefe L., Simcocks A.C., Hryciw D.H., Mathai M.L., McAinch A.J.: The cannabinoid receptor 1 and its role in influencing peripheral metabolism. *Diabetes Obes. Metab.*, 2014; 16: 294-304
- [76] Omori K., Kotera J.: Overview of PDEs and their regulation. *Circ. Res.*, 2007; 100: 309-327
- [77] Pamplona F.A., Takahashi R.N.: Psychopharmacology of the endocannabinoids: far beyond anandamide. *J. Psychopharmacol.*, 2012; 26: 7-22
- [78] Pierre S., Eschenhagen T., Geisslinger G., Scholich K.: Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2009; 8: 321-335
- [79] Piomelli D.: The molecular logic of endocannabinoid signaling. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2003; 4: 873-884
- [80] R&D Systems ELISA TEST Kit. http://www.rndsystems.com/product_detail_objectname_elisa_assay_product.aspx
- [81] Rampersad S.N., Ovens J.D., Huston E., Umana M.B., Wilson L.S., Netherton S.J., Lynch M.J., Baillie G.S., Houslay M.D., Maurice D.H.: Cyclic AMP phosphodiesterase 4D (PDE4D) tethers EPAC1 in a vascular endothelial cadherin (VE-Cad)-based signaling complex and controls cAMP-mediated vascular permeability. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 33614-33622
- [82] Reid G., Wielinga P., Zelcer N., van der Heijden I., Kuil A., de Haas M., Wijnholds J., Borst P.: The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 9244-9249
- [83] Ritter S.L., Hall R.A.: Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009; 10: 819-830
- [84] Rogers L.M., Thelen T., Aronoff D.M.: Macrophage phagocytosis of *Clostridium sordellii* is suppressed by prostaglandin E2 and intracellular cAMP signaling. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013; 69 (Suppl. 2): 45
- [85] Sachdeva S., Gupta M.: Adenosine and its receptors as therapeutic targets: an overview. *Saudi. Pharm. J.*, 2013; 21: 245-253
- [86] Sagara N., Toda G., Hirai M., Terada M., Katoh M.: Molecular cloning, differential expression, and chromosomal localization of human Frizzled-1, Frizzled-2, and Frizzled-7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 252: 117-122
- [87] Sampath J., Adachi M., Hatse S., Naesens L., Balzarini J., Flatley R.M., Matherly L.H., Schuetz J.D.: Role of MRP4 and MRP5 in biology and chemotherapy. *AAPS PharmSci.*, 2002; 4: E14
- [88] Sassone-Corsi P.: The cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2012; 4: a011148
- [89] Seifert R., Dove S.: Functional selectivity of GPCR ligand stereoisomers: new pharmacological opportunities. *Mol. Pharmacol.*, 2009; 75: 13-18
- [90] Semmler J., Gebert U., Eisenhut T., Moeller J., Schonharting M.M., Allera A., Endres S.: Xanthine derivatives: comparison between suppression of tumour necrosis factor- α production and inhibition of cAMP phosphodiesterase activity. *Immunology*, 1993; 78: 520-525
- [91] Serezani C.H., Ballinger M.N., Aronoff D.M., Peters-Golden M.: Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2008; 39: 127-132
- [92] Shabb J.B.: Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem. Rev.*, 2001; 101: 2381-2411
- [93] Smith S.J., Brookes-Fazakerley S., Donnelly L.E., Barnes P.J., Barnette M.S., Giembycz M.A.: Ubiquitous expression of phosphodiesterase 7A in human proinflammatory and immune cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2003; 284: L279-L289
- [94] Sunahara R.K., Taussig R.: Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol. Interv.*, 2002; 2: 168-184
- [95] Sutherland E.W., Rall T.W.: Fractionation and characterization of a cyclic adenosine ribonucleotide formed by tissue particles. *J. Biol. Chem.*, 1958; 232: 1077-1091
- [96] Szumiło M., Rahden-Staroń I.: Fosfolipaza C zależna od fosfodyloinozytolu w komórkach ssaków – budowa, właściwości i funkcja. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2008; 62: 47-54
- [97] Taylor S.S., Yang J., Wu J., Haste N.M., Radzio-Andzelm E., Anand G.: PKA: a portrait of protein kinase dynamics. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1697: 259-269

- [98] Thermo Scientific Cyclic AMP Competitive ELISA Kit, Multi-species (18.02.2014)
- [99] Theron A.J., Steel H.C., Tintinger G.R., Feldman C., Anderson R.: Can the anti-inflammatory activities of β 2-agonists be harnessed in the clinical setting? *Drug Des. Devel. Ther.*, 2013; 7: 1387-1398
- [100] Tresguerres M., Levin L.R., Buck J.: Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney Int.*, 2011; 79: 1277-1288
- [101] TT401 for type 2 diabetes and obesity. <http://www.transition-therapeutics.com/technology/tt401.php> (05.01.2015)
- [102] Ullmann A., Danchin A.: Role of cyclic AMP in regulatory mechanisms in bacteria. *Trends Biochem. Sci.*, 1980; 5: 95-96
- [103] van Aubel R.A., Smeets P.H., Peters J.G., Bindels R.J., Russel F.G.: The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2002; 13: 595-603
- [104] Vang T., Torgersen K.M., Sundvold V., Saxena M., Levy F.O., Skalhegg B.S., Hansson V., Mustelin T., Tasken K.: Activation of the COOH-terminal Src kinase (Csk) by cAMP-dependent protein kinase inhibits signaling through the T cell receptor. *J. Exp. Med.*, 2001; 193: 497-507
- [105] Vaudry D., Falluel-Morel A., Bourgault S., Basille M., Burel D., Wurtz O., Fournier A., Chow B.K., Hashimoto H., Galas L., Vaudry H.: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol. Rev.*, 2009; 61: 283-357
- [106] Vuguin P.M., Charron M.J.: Novel insight into glucagon receptor action: lessons from knockout and transgenic mouse models. *Diabetes Obes. Metab.*, 2011; 13 (Suppl.1): 144-150
- [107] Wang D., Luo P., Wang Y., Li W., Wang C., Sun D., Zhang R., Su T., Ma X., Zeng C., Wang H., Ren J., Cao F.: Glucagon-like peptide-1 protects against cardiac microvascular injury in diabetes via a cAMP/PKA/Rho-dependent mechanism. *Diabetes*, 2013; 62: 1697-1708
- [108] Wojcik W., Olianias M., Parenti M., Gentleman S., Neff N.H.: A simple fluorometric method for cAMP: application to studies of brain adenylate cyclase activity. *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 1981; 7: 27-35
- [109] Woo A.Y., Wang T.B., Zeng X., Zhu W., Abernethy D.R., Wainer I.W., Xiao R.P.: Stereochemistry of an agonist determines coupling preference of β 2-adrenoceptor to different G proteins in cardiomyocytes. *Mol. Pharmacol.*, 2009; 75: 158-165
- [110] Woodward D.F., Jones R.L., Narumiya S.: International union of basic and clinical pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol. Rev.*, 2011; 63: 471-538
- [111] Wyska E.: Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of methylxanthine derivatives in mice challenged with high-dose lipopolysaccharide. *Pharmacology*, 2010; 85: 264-271
- [112] Wyska E.: Pretreatment with R(+)-verapamil significantly reduces mortality and cytokine expression in murine model of septic shock. *Int. Immunopharmacol.*, 2009; 9: 478-490
- [113] Xu R.X., Hassell A.M., Vanderwall D., Lambert M.H., Holmes W.D., Luther M.A., Rocque W.J., Milburn M.V., Zhao Y., Ke H., Nolte R.T.: Atomic structure of PDE4: insights into phosphodiesterase mechanism and specificity. *Science*, 2000; 288: 1822-1825
- [114] Yan L., Herrmann V., Hofer J.K., Insel P.A.: β -adrenergic receptor/cAMP-mediated signaling and apoptosis of S49 lymphoma cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2000; 279: C1665-C1674
- [115] Yang H., Yang X., Cao J., Li S., Liu Y., Suo Z.W., Cui H.B., Guo Z., Hu X.D.: cAMP-dependent protein kinase activated Fyn in spinal dorsal horn to regulate NMDA receptor function during inflammatory pain. *J. Neurochem.*, 2011; 116: 93-104
- [116] Zaccolo M., Movsesian M.A.: cAMP and cGMP signaling cross-talk: role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology. *Circ. Res.*, 2007; 100: 1569-1578
- [117] Zaccolo M., Pozzan T.: Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*, 2002; 295: 1711-1715
- [118] Zhang L., Zhang H., Wang J., Pan C.: Determination of trace level of cAMP in *Locusta Migratoria Manilensis* Meyen by HPLC with fluorescence derivation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2006; 7: 266-273
- [119] Zhang Y., Geiger J.D., Lutt W.W.: Improved high-pressure liquid chromatographic-fluorometric assay for measurement of adenosine in plasma. *Am. J. Physiol.*, 1991; 260: G658-G664
- [120] ZP2929 - Type 2 diabetes/Obesity. <http://zealandpharma.com/product-pipeline/cardio-metabolic-diseases/zp2929> (05.01.2015)

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.