



Università degli Studi di Firenze

DOTTORATO DI RICERCA IN
"NEUROSCIENZE"

CICLO XXIV

COORDINATORE Prof. Massacesi Luca

*"Modalità di liberazione di adenosina ed effetti protettivi del
dipiridamolo ed antagonista dei recettori A_{2A} adenosinici in
modelli di ischemia cerebrale cronica e focale"*

Settore Scientifico Disciplinare BIO/14

Dottorando

Dott. CORTI FRANCESCA

Francesca Corti

Tutore

Prof. PEDATA FELICITA

Felicia Pedata

Anni 2009/2012

Luca Massacesi

INDICE

<i>Nome per esteso delle sigle citate nel testo</i>	<i>pag. VIII</i>
Abstract of the study	<i>pag. 1</i>
INTRODUZIONE	<i>pag. 3</i>
1. ADENOSINA	<i>pag. 4</i>
1.1 Sintesi	<i>pag. 5</i>
1.2 Rilascio	<i>pag. 6</i>
1.3 Catabolismo	<i>pag. 8</i>
2. RECETTORI PER ADENOSINA	<i>pag. 9</i>
2.1 Recettori A_1	<i>pag. 10</i>
2.1.1 Struttura molecolare, funzione e localizzazione nel SNC	<i>pag. 10</i>
2.1.2 Farmacologia	<i>pag. 12</i>
2.2 Recettori A_{2A}	<i>pag. 13</i>
2.2.1 Struttura molecolare, funzione e localizzazione nel SNC	<i>pag. 13</i>
2.2.2 Farmacologia	<i>pag. 14</i>
2.3 Recettori A_{2B}	<i>pag. 15</i>
2.3.1 Struttura molecolare, funzione e localizzazione nel SNC	<i>pag. 15</i>
2.3.2 Farmacologia	<i>pag. 16</i>
2.4 Recettori A_3	<i>pag. 16</i>
2.4.1 Struttura molecolare, funzione e localizzazione nel SNC	<i>pag. 16</i>
2.4.2 Farmacologia	<i>pag. 17</i>
3. ATP	<i>pag. 18</i>
3.1 Sintesi	<i>pag. 19</i>
3.2 Deposito	<i>pag. 19</i>

3.3 Rilascio	<i>pag. 21</i>
3.4 Catabolismo extracellulare	<i>pag. 23</i>
4. RECETTORI PER ATP	<i>pag. 27</i>
4.1 Recettori P2X	<i>pag. 27</i>
4.1.1 Struttura molecolare, funzione e localizzazione nel SNC	<i>pag. 28</i>
4.1.2 Farmacologia	<i>pag. 31</i>
4.2 Recettori P2Y	<i>pag. 33</i>
4.2.1 Struttura molecolare, funzione e localizzazione nel SNC	<i>pag. 33</i>
4.2.2 Farmacologia	<i>pag. 36</i>
5. ISCHEMIA CEREBRALE	<i>pag. 36</i>
5.1 Patobiologia dell'ischemia	<i>pag. 38</i>
5.1.1 Eccitotossicità mediata da glutammato	<i>pag. 39</i>
5.1.2 Stress ossidativo	<i>pag. 40</i>
5.1.3 Segnalazione di stress in risposta ad ischemia	<i>pag. 41</i>
5.1.4 Reazioni infiammatorie	<i>pag. 43</i>
5.1.5 Morte cellulare in ischemia cerebrale	<i>pag. 44</i>
6. MODELLI ANIMALI DI ISCHEMIA CEREBRALE	<i>pag. 46</i>
7. FARMACI UTILIZZATI NELLA RICERCA	<i>pag. 50</i>
7.1 Il dipiridamolo	<i>pag. 50</i>
7.2 I polioxometallati (POM-4)	<i>pag. 53</i>
7.3 Antagonista selettivo per i recettori A2A per adenosina, SCH58261	<i>pag. 55</i>
SCOPO DELLA RICERCA	<i>pag. 57</i>
1. ESPERIMENTI SUL MODELLO DI OCCLUSIONE DELLE ARTERIE CAROTIDI COMUNI (2VO) CON SOMMINISTRAZIONE DI DIPIRIDAMOLO	<i>pag. 58</i>

2. ESPERIMENTI SUL RILASCIO DI ATP ED ADENOSINA, IN CONDIZIONI NORMOSSICHE ED ISCHEMICHE, DALLO STRIATO DI RATTO	<i>pag. 58</i>
3. ESPERIMENTI SUL MODELLO DI OCCLUSIONE TRANSIENTE DELL'ARTERIA CEREBRALE MEDIA (tMCAo) CON SOMMINISTRAZIONE DI SCH58261	<i>pag. 59</i>
MATERIALI E METODI	<i>pag. 60</i>
1. ANIMALI DA ESPERIMENTO	<i>pag. 61</i>
2. OCCLUSIONE BILATERALE DELLE ARTERIE CAROTIDI COMUNI	<i>pag. 61</i>
2.1 <i>Tecnica operatoria</i>	<i>pag. 61</i>
2.2 <i>Impianto della pompa osmotica</i>	<i>pag. 63</i>
3. MICRODIALISI VERTICALE	<i>pag. 64</i>
3.1 <i>Probe verticale</i>	<i>pag. 65</i>
3.2 <i>Tecnica operatoria</i>	<i>pag. 66</i>
3.3 <i>Raccolta di campioni di dialisato cerebrale</i>	<i>pag. 67</i>
4. ESPERIMENTO DI RECUPERO <i>in vitro</i>	<i>pag. 68</i>
5. DOSAGGIO DI ATP	<i>pag. 69</i>
6. DOSAGGIO DI ADENOSINA	<i>pag. 71</i>
7. OCCLUSIONE DELL'ARTERIA CEREBRALE MEDIA	<i>pag. 72</i>
7.1 <i>Tecnica operatoria</i>	<i>pag. 72</i>
7.2 <i>Preparazione del filamento da occlusione</i>	<i>pag. 74</i>
8. SOMMINISTRAZIONE DEI FARMACI	<i>pag. 74</i>
9. TEST COMPORTAMENTALI	<i>pag. 75</i>
9.1 <i>Esame Obiettivo Neurologico (EON)</i>	<i>pag. 75</i>
9.2 <i>Modified Neurological Sensivity Score TEST (mNSS)</i>	<i>pag. 76</i>

9.3 Object Recognition Test (ORT)	<i>pag. 78</i>
9.4 Y Maze Test	<i>pag. 79</i>
9.5 Rotarod Test	<i>pag. 80</i>
10. ANALISI ISTOLOGICA	<i>pag. 80</i>
10.1 Perfusion trans cardiaca	<i>pag. 81</i>
10.2 Estrazione, congelamento e taglio dei cervelli	<i>pag. 81</i>
10.3 Cresyl violetto ed Ematossilina/Eosina	<i>pag. 82</i>
11. ANALISI IMMUNOISTOCHIMICA	<i>pag. 83</i>
11.1 Immunofluorescenza	<i>pag. 84</i>
12. MICROSCOPIO ELETTRONICO	<i>pag. 85</i>
12.1 Microscopio elettronico convenzionale	<i>pag. 85</i>
12.2 Immunolocalizzazione in microscopia elettronica	<i>pag. 85</i>
13. ISOLAMENTO DELLE VESCICOLE SINAPTICHE	<i>pag. 86</i>
14. WESTERN BLOT DI SINAPTOFISINA E CNT2	<i>pag. 87</i>
15. ANALISI STATISTICA DEI DATI	<i>pag. 88</i>
RISULTATI	<i>pag. 89</i>
1. ESPERIMENTI SUL MODELLO DI OCCLUSIONE DELLE ARTERIE CAROTIDI COMUNI (2VO) CON SOMMINISTRAZIONE DI DIPYRIDAMOLO	
1.1 Valutazione del deficit neurologico mediante Esame Obiettivo Neurologico (EON)	<i>pag. 90</i>
1.2 Valutazione della memoria non spaziale mediante Object Recognition Test (ORT)	<i>pag. 91</i>
1.3 Valutazione della memoria spaziale mediante Y Maze Test	<i>pag. 92</i>
1.4 Valutazione istologica ed immunoistochimica	<i>pag. 93</i>

2. ESPERIMENTI SUL RILASCIO DI ATP ED ADENOSINA, IN CONDIZIONI NORMOSSICHE ED ISCHEMICHE, DALLO STRIATO DI RATTO

- 2.1 Valutazione del deficit neurologico e del danno ischemico 24h dopo MCAo*
pag. 96
- 2.2 Effetto degli inibitori delle ecto-ATPasi, POM-4 (100 μ M) e BGO136 (50nM), sul rilascio di ATP e adenosina nello striato di ratto in condizioni normossiche.*
pag. 97
- 2.3 Effetto di dipiridamolo (100 μ M), inibitore dei trasportatori equilibrativi dei nucleosidi (ENT), in presenza di POM-4 (100 μ M) sul rilascio di adenosina nello striato di ratto in condizioni normossiche.*
pag. 98
- 2.4 Localizzazione del trasportatore concentrativo dei nucleosidi (CNT2) sui neuroni nello striato e sulle vescicole sinaitiche*
pag. 100
- 2.5 Effetto dell'inibitore delle ecto-ATPasi, POM-4 (100 μ M), sul rilascio di ATP ed adenosina nello striato di ratto prima e dopo ischemia*
pag. 102
- 2.6 Medie delle concentrazioni di adenosina e ATP, in presenza dell'inibitore delle ecto-ATPasi, POM-4 (100 μ M), prima e dopo MCAo*
pag. 105

3. ESPERIMENTI SUL MODELLO DI OCCLUSIONE TRANSIENTE DELL'ARTERIA CEREBRALE MEDIA (tMCAo) CON SOMMINISTRAZIONE DI SCH58261

- 3.1 Valutazione del deficit motorio e sensoriale prima e dopo tMCAo*
pag. 108
- 3.2 Valutazione della coordinazione motoria e dell'equilibrio mediante rotarod test*
pag. 110
- 3.3 Valutazione della perdita di peso corporeo in seguito a tMCAo*
pag. 111
- 3.4 Valutazione istologica in seguito a tMCAo*
pag. 112

DISCUSSIONE

pag. 115

- 1. Il dipiridamolo migliora la memoria spaziale in un modello di occlusione delle arterie carotidi comuni (2VO)*
pag. 116

- 2a. In condizioni fisiologiche, in vivo, adenosina extracellulare non deriva dall'idrolisi di ATP ma è rilasciata come tale dalle cellule* pag. 119
- 2b. Modalità di rilascio di adenosina in condizioni fisiologiche* pag. 120
- 2c. In condizioni ischemiche, in vivo, adenosina deriva dall'idrolisi di ATP* pag. 122
- 3. Somministrazione cronica di SCH58261, antagonista selettivo dei recettori A2A di adenosina, in un modello in vivo di tMCAo* pag. 124

BIBLIOGRAFIA

pag. 127

Nome per esteso delle sigle citate nel testo

2Me-SATP	2-metil-tio-ATP
2VO	occlusione bilaterale delle arterie carotidi comuni
8-CPT	8-ciclopentilteofillina
8-PT	8-fenilteofillina
α,β-meATP	α,β -metilene ATP
ADA	adenosina deaminasi
ADP	adenosina difosfato
AICLA	accidents ischémiques cérébraux liés à l'athérosclérose
AK	adenosina chinasi
AMP	adenosina monofosfato
AMPA	acido α -ammino-3-idrossil-5-metil-4-isoxazolo propionico
ANOVA	analisi della varianza
AOPCP	α,β -metileneADP
ARL67156	6-N,N-dietil-D- β,γ -dibromometilene ATP
ASA	acido acetil salicilico
ATIII	antitrombina III
ATP	adenosina trifosfato
BICL	legatura bilaterale delle carotidi interne
BGO136	1-hydroxynaphthalene-3,6-disulfonate
BzATP	Benzoyl ATP
cAMP	adenosina monofosfato ciclico
CAT	catalasi
CADO	2-cloroadenosina
CBF	flusso sanguigno cerebrale
CCA	occlusione bilaterale delle arterie carotidi comuni
CCPA	2-cloro-N6-ciclopentiladenosina
CD40L	ligando di CD40
CE	endoarterectomia
CFTR	Cystic fibrosis trans membrane conductance regulator
cGMP	guanosina monofosfato ciclico
CGS21680	2-[p-(2-carbonil-etil)-feniletilamino]-5'-N-etilcarbossamidoadenosina
CHA	N6-cicloesiladenosina
CI-IB-MECA	cloro-N6-(3-iodobenzil)-adenosina-5'-N-metil-uronamide

CNT trasportatore concentrativo dei nucleosidi
COX ciclossigenasi o prostaglandino sintetasi
CP 66713 4-amino-8-cloro-1-fenil[1,2,4]triazolo[4,3-
CPA N6-ciclopentiladenosina
CR3 recettori del complemento di tipo 3
CSC (8-(-3-clorostiril)-caffeina)
CX3C fractalkina
CX3CR1 recettore della fractalkina
DAG diacilglicerolo
DI indice di discriminazione
DIDS 4,4'-diisotiocianato-stilbene-2,2'-disulfonato
DNA acido desossiribonucleico
DPCPX 8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina
DPMA N6-[2-(3,5-dimetossifenil)-etil]
DPMX 3,7-dimetil-1-propilxantine
E-5'-NT 5'-ectonucleotidasi
EC/IC bypass bypass extra/intracraniale
ECG elettroencefalogramma
ecto-ALP ecto-fosfatasi alcalina
EDRF fattore rilassante derivato dall'endotelio
ENT trasportatore equilibrativo dei nucleotidi
EON esame obiettivo neurologico
GABA acido γ -ammino butirrico
GC guanilato ciclasti
GDP guanosina difosfato
GFAP proteina acida fibrillare gliale
GPx glutatione perossidasi
GSH glutatione
GTP guanosina trifosfato
HPLC cromatografia liquida ad alta pressione
IB-MECA N6-(3-iodobenzil)-5'-N-metilcarbossamidoadenosina
ICAM molecole di adesioni intracellulare
IgG immunoglobulina G
IL interleuchina

IP3 inositol-trifosfato
IP5I (P5-di[inosina-5'] pentafosfato)
KF 15372 8-(dicropropilmetil)-1,3-dipropilxantina
KF 17837 1,3-dipropil-8-(3,4-dimetossistiril)-7-metilxantina
KFM 19 8-(3-oxociclopentil)-1,3-dipropilxantina
KW 3902 1,3-dipropil-8-noradamantilxantina
LTP long-term potentiation
MAG glicoproteine associate alla mielina
MAP-2 proteina associata ai microtubuli 2
MAPK protein-chinasi attivate da mitogeno
MCA arteria cerebrale media
MCAo occlusione dell'arteria cerebrale media
MCP-1 monocyte chemoattractant protein-1
MDR Multi Drug Resistance
MHC maggior complesso di istocompatibilità
MIP-1 α macrophage inflammatory protein-1 α
MMP-9 metalloproteinasi 9
mNSS modified Neurological Sensitivity Score
MRS1220 9-cloro-2-(2-furil)-5-fenilacetilamino[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolina
MRS1454 N-(4-Cyano-phenyl)-2-[4-(2,6-dioxo-1,3-dipropyl-2,3,4,5,6,7-hexahydro-1H-purin-8-yl)-phenoxy]-acetamide
mRNA messaggero dell'acido ribonucleico
MTA 5' deossi 5' metiltioadenosina
NANC non-adrenergico non-cholinergico
NaOH idrossido di sodio
NECA 5'-N-adenosina etilcarbrossammide
NF κ B fattore nucleare kappa B
NMDA n-metil-d-aspartato
NO ossido nitrico
NOS nitrossido sintasi
NPPs ecto-pirofosfatasi o fosfodiesterasi
NTPDasi ecto-nucleoside trifosfato difosfoidrolasi
ORT object recognition test
OX-42 anticorpo diretto contro i recettori del complemento di tipo 3

PAF fattore attivante le piastrine
PBSB tampone fosfato a bassa molarità
PDE guanosina monofosfato ciclico fosfodiesterasi
PDGF fattore di crescita di derivazione pistrinica
PGI2 prostaglandina o prostaciclina I2
PI preconditionamento ischemico
PID depolarizzazione peri-infartuale
PKC protein-chinasi C
PKG proteina chinasi G
PLA2 fosfo-lipasi A2
PLC fosfo-lipasi C
POM-4 hexapotassium dihydrogen monotitanoundecatungstocobaltate(II) tridecahydrate
PPADS piridossal-fosfato-6-azophenyl-2',4'-disolfonato
QA acido quinolinico
RB2 Reactive Blue 2
RIND deficit neurologici ischemici reversibili
ROS radicali liberi dell'ossigeno
SAH S-adenosilomocisteina
SAM S-adenosilmetionina
SCH58261 7-(2-feniletil)-5-amino-2-(2-furil)-pirazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidina
SEM errore standard della media
SNC sistema nervoso centrale
SNP sistema nervoso periferico
SOD superossidodismutasi
Suramina acido 8-3-benzamido-4-metilbenzammido-naftalene-1,3,5-trisulfonico
TGF- β fattore di crescita trasformante beta
TIA attacco ischemico transitorio
TM trans membrana
tMCAo occlusione transiente dell'arteria cerebrale media
TNF fattore di necrosi tumorale
tPA attivatore tissutale del plasminogeno
uPA attivatore di tipo urochinasi del plasminogeno
VASP vasodilator-stimulated phosphoprotein
VCAM molecole di adesione delle cellule vascolari

vWF fattore di von Willebrand

ZM241385 4-(2-[7-amino-2-(2-furil)-{1,2,4-triazolo{2,3-a}{1,3,5}triazin-5-ilamino]etil)
fenolo

Abstract of the study

“Modalities of adenosine release and protective effects of dipyridamole and adenosine A_{2A} receptor antagonist in models of chronic and focal cerebral ischemia.”

A first aim of my studies was that of investigating the effect of intravenous administration of dipyridamole in a model of chronic ischemia obtained by bilateral common carotid artery occlusion (2VO). Chronic ischemia is a progressive, dynamic process, caused by cerebral hypoperfusion that may manifest with cognitive dysfunction as ischemic conditions persist, and ultimately leads to neuronal death. No pharmacological therapy able to improve cognitive performances of patients with chronic vascular pathologies is yet available. Dipyridamole was introduced into clinical medicine in the early 1960s as a coronary vasodilator. It is a potent inhibitor of platelet activation, reduces formation of thrombi *in vivo* and it is an antithrombotic agent used for secondary stroke prevention in combination with aspirin. Recent evidence indicates that dipyridamole has anti-inflammatory properties. Chronic cerebral hypoperfusion in the rat induced by 2VO is recognized as a valid model of chronic cerebral hypotension and it is assumed that it mimics, although with some limitations, a situation of chronic hypoperfusion-induced human dementia. Our results show that dipyridamole reverses the impairment of spatial working memory, evaluated by Y-Maze test, 90 days after 2VO. This protective effect might be in relation to dipyridamole's anti-inflammatory properties.

A subsequent goal of my studies was that of investigating on the source of extracellular adenosine release, under physiological and ischemic conditions, in the striatum of rat, using a selective inhibitor of the ATP degradation, POM-4 (100 μ M). Under physiological conditions, in the presence of POM4, the extracellular concentration of ATP increased significantly but the adenosine concentration was not altered. This result demonstrates that, under physiological conditions, adenosine is not a product of extracellular ATP. To assess if adenosine outflow occurred through the equilibrative nucleoside transporter (ENT), the adenosine transporter inhibitor, dipyridamole (100 μ mol/L), was added to PV4. In the presence of PV4 plus dipyridamole, adenosine outflow progressively increased indicating that adenosine is transported in cells and it is not transported out of cells by ENT. By immunoelectron microscopy, we demonstrated the presence of the concentrative nucleoside transporter CNT2 on plasma and vesicle membranes isolated from the rat striatum. These results are in favor that adenosine is transported in vesicles and is released in an excitation-secretion manner under *in vivo* physiological conditions.

Under ischemic conditions, induced by middle cerebral artery occlusion (MCAo), adenosine concentrations increased in vehicle-treated rats in the first 4 hours after MCAo. In the presence of POM-4, extracellular ATP concentrations were increased by about 10 times and adenosine concentrations significantly decreased. Results demonstrated that early after ischemia, extracellular ATP is hydrolyzed by ecto-nucleotidases and significantly contributes to the increase in extracellular adenosine. To establish the contribution of extracellular ATP to adenosine might constitute the basis for devising a correct putative purinergic strategy aimed at protection from ischemic damage.

In the last part of my PhD studies, I investigated on the effect of the selective adenosine A_{2A} receptor antagonist, SCH58261, at extended periods after focal ischemia induced by transient MCAo (1 hour) in the rat. SCH58261, chronically administered (i.p twice/day for 7 days), was protective from neurological deficit and motor deficiency 1 day after ischemia but it is not protective 7 days after tMCAo. Seven days after tMCAo, it did not protected against tissue infiltration. Our results indicate that SCH58261 is protective when administered in the first hours after ischemia by reducing cerebral excitotoxicity but it is not able to reduce infiltration and inflammatory cascade in the ischemic brain area at extended periods after ischemia.

Introduzione

1. ADENOSINA

Adenosina (Fig. 1) è una sostanza neuromodulatrice e neuroprotettiva del sistema nervoso centrale (SNC) con una funzione generalmente citoprotettiva (Fredholm et al., 2001). I suoi effetti sulla protezione e riparo tissutale si esplicano in 4 modalità: aumentando il rifornimento di ossigeno se richiesto, proteggendo contro danno ischemico, innescando le risposte anti-infiammatorie e promuovendo il processo angiogenetico (Linden, 2005).

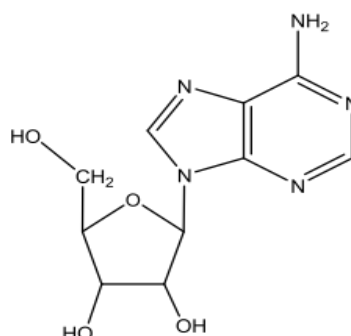


Figura 1. Struttura molecolare di adenosina

Questo nucleoside ha un ruolo molto importante nella regolazione di numerose funzioni fisiologiche, in differenti tipi cellulari (neuroni, piastrine, mastcellule, cellule muscolari lisce, miociti), poiché modula la neurotrasmissione, la conduzione, la vasodilatazione, la proliferazione e la morte cellulare.

Molte delle azioni mediate da adenosina, sono in grado di proteggere la cellula e i tessuti durante situazioni di stress, come l'ischemia o l'ipossia. Questo nucleoside ha un'azione antinfiammatoria (Cronatein, 1994), ma ha anche proprietà analgesiche (Sawynnok e Sweeney, 1989) e può essere un potente soppressore del sistema immunitario (Spychala et al., 1997).

Adenosina è in grado di agire sia a livello del SNC che periferico. Nel 1929 Drury e Szent-Giorgyi dimostrarono come la somministrazione sistemica di adenosina in animali anestetizzati inducesse fugaci effetti come: bradicardia, vasodilatazione, diminuzione della pressione sanguigna e della motilità intestinale. Negli anni '70 Sattin e Rall dimostrarono un ruolo specifico di adenosina nel SNC, scoprendo che

questa era in grado di aumentare la formazione di c-AMP in fettine cerebrali di mammifero, effetto che era inibito dalle metilxantine: caffeina e teofillina.

In seguito fu dimostrato il ruolo deprimente di adenosina sulla scarica dei neuroni corticali (Phillis et al., 1979), cerebellari (Kostopoulos et al., 1975) e sui potenziali sinaptici eccitatori di fettine corticali e di ippocampo (Kuroda et al., 1976; Dunwiddie e Hoffer, 1980; Okada e Ozawa, 1980). Fu inoltre dimostrato il ruolo inibitorio di adenosina sul rilascio di acetilcolina in diverse aree cerebrali (Harms et al. 1978), sul rilascio di dopamina (Michealis et al., 1979), noradrenalina (Harms et al., 1978), aminoacidi eccitatori (Corradetti et al., 1984) e serotonina (Harms et al., 1979). Tutti questi effetti erano inibiti dalle metilxantine, aumentati da inibitori del reuptake di adenosina e correlati con la modificazione dei livelli di c-AMP.

1.1 Sintesi

Nel SNC la formazione di adenosina si verifica per defosforilazione di AMP operata da 5'-nucleotidasi, enzimi presenti sia intracellularmente, 5'-endonucleotidasi, che extracellularmente, 5'-ectonucleotidasi (Zimmermann et al., 1995) (Fig. 2).

La 5'-endonucleotidasi è inibita da alte concentrazioni di ATP e di ADP e il suo normale valore di affinità per il substrato ($K_m=1-14$ mM) risulta essere più elevato della concentrazione fisiologica di AMP intracellulare, quindi una produzione massiva di adenosina può verificarsi soltanto in seguito ad uno squilibrio energetico, condizione nella quale si ha una riduzione della concentrazione intracellulare di ATP e di ADP derivato dalla defosforilazione di ATP, e la conseguente attivazione dell'enzima (Meghji, 1993). Uno squilibrio energetico può avvenire sia in condizioni fisiologiche che patologiche: la normale attività elettrica neuronale induce un consumo di ATP superiore alle capacità di resintesi, con una conseguente produzione di adenosina (Dunwiddie e Fredholm, 1997); in condizioni patologiche come l'ischemia, lo squilibrio energetico è massivo e la conseguente massiva produzione di AMP è il meccanismo chiave per la formazione di adenosina (Melani et al., 2006) che non può per altro in assenza di ossigeno e glucosio essere efficientemente fosforilata ad ATP. Grazie all'azione delle 5'-ectonucleotidasi, i nucleotidi rilasciati all'esterno della cellula, possono essere trasformati in adenosina. Questi enzimi sono omodimeri legati

alla membrana plasmatica per mezzo del glicosil-fosfatidilinositolo, e hanno il proprio sito catalitico rivolto all'esterno nello spazio extracellulare, ed è qui che svolgono la propria azione.

A livello del SNC, le 5'-ectonucleotidasi sono prevalentemente associate alle cellule gliali ma sono state rilevate anche nella zona sinaptica. Questi enzimi sono stati individuati sulla membrana plasmatica degli astrociti, degli oligodendrociti e della microglia (Naidu, 1962; Kruetzberg et al., 1978; Schoen e Kruetzberg, 1995).

Un altro enzima in grado di formare adenosina è la fosfatasi alcalina, capace di catalizzare l'idrolisi di ATP fino ad arrivare ad adenosina (Zimmermann, 2000).

Una fonte di adenosina extracellulare è rappresentata dal c-AMP che, nello spazio extracellulare, può essere convertito a 5'-AMP dalle ecto-fosfodiesterasi, e poi ad adenosina dalle 5'-ectonucleotidasi. Il c-AMP, può anche essere convertito in 5'-AMP all'interno della cellula, sarà poi rilasciato nello spazio cellulare rappresentando così una fonte di adenosina. Questo suggerisce che molti neurotrasmettitori che agiscono su recettori metabotropi collegati all'adenilato ciclasi, potrebbero regolare i livelli di adenosina e quindi gli effetti inibitori nel SNC, incrementando l'accumulo di c-AMP. Questo modo di formazione di adenosina è efficiente comunque solo in condizioni di lavoro estremo.

Adenosina può anche derivare dall'idrolisi della S-adenosilomocisteina (SAH) ad opera dell'enzima SAH-idrolasi (Fig. 2); tale reazione si verifica in particolare a livello cardiaco, dove SAH rappresenta un'importante fonte intracellulare di adenosina, ma solo in condizioni fisiologiche e non in condizioni ipossiche (Latini et al., 1995). A livello neuronale questa via di sintesi non contribuisce significativamente alla produzione di adenosina né in condizioni normossiche né ipossiche (Pak et al., 1994; Latini et al., 1995).

1.2 Rilascio

La modalità di rilascio di adenosina può differire a seconda delle condizioni sperimentali. In seguito a stimolazione elettrica *in vitro*, adenosina sembra originare dalle cellule con un meccanismo essenzialmente di tipo citosolico, mentre in modelli sperimentali ischemici *in vitro*, adenosina potrebbe avere anche un'origine

extracellulare dovuta alla degradazione dei nucleotidi adenosinici liberati in seguito a modificazioni della permeabilità di membrana (Pedata et al., 1993).

Le concentrazioni extracellulari di adenosina sono regolate da un trasporto bidirezionale mediato da trasportatori. Questi trasportatori sono stati suddivisi in due categorie: quelli in grado di trasportare, in entrambe le direzioni, indistintamente purine e pirimidine attraverso la membrana plasmatica, seguendo il gradiente di concentrazione (equilibrativi); ed i trasportatori che mediano l'influsso dei nucleotidi grazie all'accoppiamento con trasportatori del sodio (concentrativi). Entrambi questi trasportatori sono stati clonati e denominati: ENT1 ed ENT2 i trasportatori secondo gradiente, CNT1 e CNT2, quelli concentrativi (Williams e Jarvis, 1991; Anderson et al., 1996; Baldwin et al., 1999). Il rilascio di adenosina da parte del terminale presinaptico può avvenire mediante il trasportatore bidirezionale che ne facilita la diffusione secondo gradiente di concentrazione. In studi effettuati su sinaptosomi cerebrali, fettine ippocampali e colture gliali, il dipiridamolo, che è un inibitore del carrier, determina una riduzione delle concentrazioni extracellulari di adenosina e un conseguente aumento dei suoi livelli intracellulari (Fredholm et al., 1980; Jonzon e Fredholm, 1985; Menghji et al., 1989). Il trasportatore lavora in modo bidirezionale per mantenere le concentrazioni intracellulare ed extracellulare di adenosina nell'ordine di 30-300 nM (Dunwiddie e Fredholm, 1997).

I livelli extracellulari di adenosina sono aumentati mediante stimolazione elettrica di fettine cerebrali *in vitro* (Pedata et al., 1988; 1990) oppure tramite agenti depolarizzanti quali lo ione K^+ , veratridina od ouabaina sia *in vitro* che *in vivo* (Jhamandas e Dumbille, 1980; Hollins e Stone, 1980).

È stato osservato che la tetrodotossina (TTX) blocca completamente il rilascio di adenosina in fettine cerebrali stimulate elettricamente, ma anche che una riduzione del Ca^{2+} extracellulare provoca una marcata riduzione della sua liberazione (Pedata et al., 1990), facendo ipotizzare una liberazione di adenosina con modalità Ca^{2+} -dipendente in seguito ad attività elettrica propagata in modo tipico delle cellule nervose.

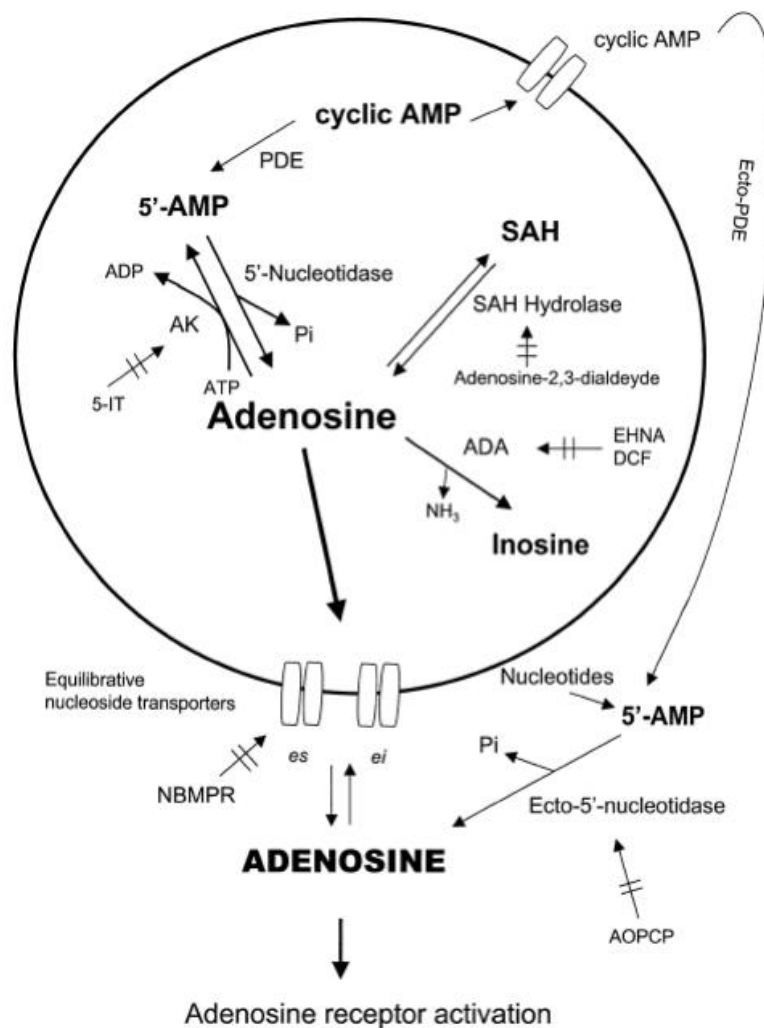


Figura 2. Sintesi, catabolismo e trasporto di adenosina. Adenosina viene prodotta intracellularmente dalla defosforilazione di AMP o dall'idrolisi di SAH e rilasciata dalla cellula grazie a specifici trasportatori di membrana oppure viene formata extracellularmente dall'idrolisi di ATP. Adenosina viene convertita in inosina dalla deaminazione da parte di ADA.

ADA, adenosina deaminasi; AK, adenosina chinasi; AOPCP, α,β -metileneADP; DCF, deossicolormicina; EHNA, eritro-9-(2-idrossil-3-nonil)adenosina; es, trasportatore sensibile; ei, trasportatore insensibile; 5-IT, 5-iodotubercidina; NBMPR, nitrobenziltioinosina; PDE, cAMP-fosfodiesterasi; SAH, S-adenosil-omocisteina.

1.3 Catabolismo

Il metabolismo di adenosina viene regolato principalmente da due enzimi: adenosina deaminasi (ADA) e adenosina chinasi (AK) (Fig. 2). Adenosina deaminasi agisce ad alte concentrazioni di substrato, degradando adenosina ad inosina; è presente

sia a livello intracellulare che extracellulare dove, ancorato alla membrana, interviene nel processo di degradazione di adenosina extracellulare (Franco et al., 1986). Adenosina chinasi è un enzima specifico che agisce a basse concentrazioni di substrato convertendo adenosina in AMP.

Dal momento che i livelli endogeni di adenosina sono nell'ordine nanomolare, è probabile che in condizioni fisiologiche la via catabolica principale sia la fosforilazione operata da AK, mentre l'azione di ADA sia importante soltanto per notevoli aumenti di adenosina, come quelli che si verificano in corso di ischemia (Latini e Pedata, 2001).

2. RECETTORI DI ADENOSINA

I recettori di adenosina appartengono alla famiglia dei recettori purinergici di sottotipo 1, denominati P1, presenti su vari tipi cellulari: cellule muscolari lisce, cellule endoteliali, miociti cardiaci, mast-cellule, piastrine, neutrofili e linfociti, neuroni e cellule gliali. Grazie a studi molecolari e farmacologici sono stati clonati ed identificati quattro tipi di recettori adenosinergici: A_1 e A_2 , di cui vi sono due sottotipi A_{2A} e A_{2B} distinti dalla diversa affinità che mostrano per adenosina, ed il tipo A_3 (Fredholm et al., 1994).

Sono recettori accoppiati a proteine G (Fig. 3). Recettori diversi sono accoppiati a proteine G differenti: i recettori A_1 e A_3 sono accoppiati a proteine di tipo $G_{i/o}$ e hanno un effetto di tipo inibitorio sull'enzima adenilato-ciclasa riducendo così la formazione di cAMP; i recettori di tipo A_2 sono invece accoppiati a proteine G_s , le quali stimolano l'adenilato-ciclasa portando ad un aumento di cAMP intracellulare (Londos et al., 1980; Fredholm, 1982). È stato dimostrato che i livelli di adenosina aumentano in maniera rilevante in seguito ad ischemia, ipossia, eccitotossicità, infiammazione e ad altri insulti cerebrali (Pedata et al., 2001) svolgendo un'azione neuroprotettiva (Ongini et al., 1997; Cunha, 2001; Ribeiro et al., 2002; Schwarzschild et al., 2002; Fredholm et al., 2003). Tuttavia adenosina, probabilmente attraverso l'azione di un sottotipo del recettore A_2 , può anche contribuire alla neurotossicità, al danno neuronale e alla morte

cellulare (de Mendonca et al., 2000). Inoltre i membri della famiglia dei recettori di adenosina possono stimolare o inibire, in diversi tessuti o preparati cellulari, protein-chinasi attivate da mitogeni (MAPK) e quindi avere un ruolo nella proliferazione, sopravvivenza, differenziazione e morte cellulare per apoptosi o necrosi (Schulte e Fredholm, 2003).

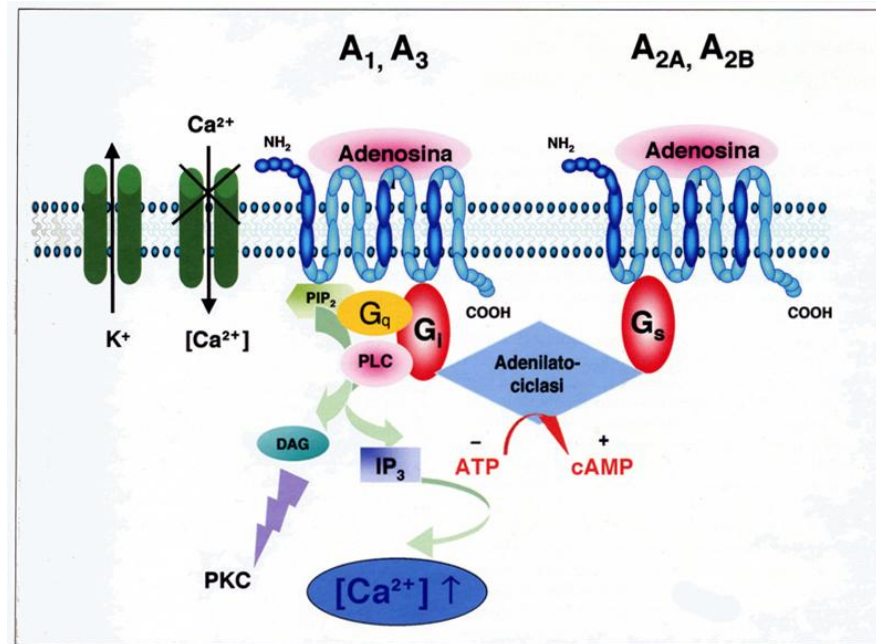


Figura 3. Recettori P1 e meccanismi di trasduzione del segnale. I recettori P1 sono recettori accoppiati a proteine G. I sottotipi A_1 e A_3 inibiscono l'adenilato ciclasi via proteina G_i , mentre i recettori A_{2A} e A_{2B} mediano la stimolazione dell'enzima via proteina G_s determinando rispettivamente un calo o un aumento dei livelli di c-AMP intracellulare. Inoltre i recettori A_1 A_3 A_{2B} possono modulare, via proteina G_o o G_q , l'attività della fosfolipasi, inducendo la produzione di diacilglicerolo (DAG) e inositol-trifosfato (IP_3) dai fosfatidilinositidi di membrana e un aumento del rilascio di calcio dai depositi intracellulari. I recettori A_1 inibiscono anche la conduttanza agli ioni Ca^{2+} e aumentano quella agli ioni K^+ .

2.1. RECETTORI A_1

2.1.1. Struttura molecolare, funzione e localizzazione nel SNC

Il recettore A_1 è una glicoproteina monomerica di 35-36 kDa costituita da 326 amminoacidi, estremamente conservata, avendo omologia tra i diversi organismi dello

87%-92%; presenta sette domini idrofobici transmembrana (TM), l'estremità NH₂-terminale esterna, la porzione COOH-terminale interna ed estesi loop intra ed extracitoplasmatici; il recettore è accoppiato a livello del III loop intracitoplasmatico con la proteina G di membrana della famiglia G_{i/o}. Gli effetti connessi alla stimolazione delle proteine G_{i/o} sono mediati sia dalla subunità α sia dal complesso $\beta\gamma$ (Birnbaumer et al., 1992) e sono di vario tipo: inibizione dell'adenilato ciclasi con riduzione dei livelli intracellulari di cAMP (Van Calker et al., 1978; Londos et al., 1980), stimolazione della conduttanza al K⁺ (Trussell e Jackson, 1985), inibizione della conduttanza al Ca²⁺ (Scholz e Miller, 1991), stimolazione della fosfolipasi C (PLC) e attivazione di un segnale calcio-protein-kinasi C (PKC) dipendente (Gerwins e Fredholm, 1992).

In condizioni fisiologiche i recettori A₁ mediano effetti sedativo-ipnotici, anti-epilettici e anti-nocicettivi (Dunwiddie, 1985) attraverso una modulazione inibitoria della trasmissione eccitatoria (Jonzon e Fredholm, 1985; Fredholm e Dunwiddie, 1988; Dunwiddie, 1985): essi infatti riducono la liberazione di neurotrasmettitori quali glutammato, noradrenalina, dopamina, serotonina e acetilcolina da neuroni presinaptici (Phillis et al., 1979 ; Okada e Ozawa, 1980; Corradetti et al., 1984) inibendo i canali del Ca²⁺ e fenomeni fosforilativi. A livello postsinaptico limitano l'eccitabilità cellulare stimolando i canali del K⁺ (Calabresi et al., 1997) e aumentando direttamente la conduttanza al Cl⁻ (Greene e Haas, 1991) stabilizzando così i potenziali di membrana; esiste infatti un meccanismo di controllo dell'eccitabilità neuronale attraverso una regolazione reciproca della liberazione di adenosina e glutammato (Deckert e Gleiter, 1994).

Nel cervello c'è un'evidente interazione fra i recettori A₁ per adenosina, i recettori D₁ per dopamina e i recettori NMDA, in quanto l'attivazione dei recettori NMDA può aumentare il rilascio di adenosina (Hoehn et al., 1990; Pedata et al., 1991; Chen et al., 1992; Delaney et al., 1998; Delaney e Geiger, 1998); l'attivazione dei recettori A₁ diminuisce anche le correnti dei recettori canale NMDA postsinaptici (de Mendoça e Ribeiro, 1993; de Mendoça et al., 1995), riducendo così la neurotossicità (Finn et al., 1991). Esiste un'interazione tra i recettori D₁ e A₁, che agiscono in modo antagonista (Ferré et al., 1994, 1998; Popoli et al., 1996).

In condizioni ischemiche adenosina, stimolando i recettori A₁, esercita un ruolo protettivo dovuto alla riduzione dell'influsso di ioni Ca²⁺, tramite l'inibizione dei

canali del Ca^{2+} di tipo N e di tipo Q (Yawo e Chuhma, 1993; Wu e Saggau, 1994), che determina una riduzione del rilascio di neurotrasmettitori eccitatori dal terminale presinaptico (Corradetti et al., 1984; Zetterström e Fillenz, 1990; Pedata et al., 1993) ed in particolare di glutammato, il quale durante ischemia esercita un ruolo citotossico dovuto principalmente all'eccessiva stimolazione dei recettori NMDA (Choi, 1990). In vari modelli ischemici, sia in vivo che in vitro, è stato dimostrato che adenosina e agonisti selettivi dei recettori A_1 mostrano un'attività neuroprotettiva determinando una riduzione del danno neurologico (Logan et al., 1997; Von Lubitz, 1999).

I recettori A_1 sono espressi in tutto il SNC, ma a livelli più elevati in corteccia, ippocampo, cervelletto (Reppert et al., 1991) e nelle corna dorsali del midollo spinale, sono presenti sia sui terminali presinaptici che postsinaptici (Deckert e Jorgensen, 1988) ma anche in posizione extrasinaptica lungo i dendriti neuronali e sugli astrociti (Rudolphi et al., 1992). Inoltre è stata descritta la presenza dei recettori A_1 sulle terminazioni cortico-striatali glutammatergiche, sulle fibre nigro-striatali dopaminergiche e sulle collaterali degli assoni intrastriatali colinergici (Impagniatello et al., 2000).

2.1.2 Farmacologia

Agonisti. Gli agonisti selettivi per il recettore A_1 sono stati sintetizzati mediante modificazioni dell'anello purinico o del ribosio. Una sostituzione in posizione N6 conferisce una maggiore affinità al composto, come risulta in N6-ciclopentiladenosina (CPA); un suo derivato, 2-cloro-N6-ciclopentiladenosina (CCPA) mostra un'affinità leggermente maggiore per il recettore. Agonisti analoghi di adenosina sono anche 2-cloroadenosina (CADO) e N6-(L-2-fenilisopropil)-adenosina (L-PIA). Altri antagonisti selettivi, in ordine crescente di affinità, sono: N6-cicloesiladenosina (CHA) e N6-(R-fenilisopropil)-adenosina (R-PIA) (Jacobson et al., 1992).

Antagonisti. Le metilxantine sono antagonisti non selettivi dei recettori di adenosina anche a basse concentrazioni (Sattin e Rall, 1970). Antagonisti con un'elevata affinità sono stati sintetizzati a partire da teofillina per sostituzione, in posizione 8, con un gruppo cicloalchilico (8-CPT, 8-PT) e quindi dalla successiva

modificazione dei gruppi metilici delle 8-CPT con gruppi propilici; tali modificazioni hanno portato alla sintesi di DPCPX (8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina), antagonista selettivo ad alta affinità (Bruns et al., 1987). La sostituzione del gruppo propilico in posizione 3 del DPCPX con un gruppo più complesso ha portato alla sintesi di BWA A884U (Patel et al., 1988), composto più selettivo del precedente. Altri derivati come KFM19, KW3902, KF15372 e ENBX, scarsamente solubili in acqua, sono stati ottenuti effettuando sostituzioni in posizione 8 sulla teofillina (Jacobson et al., 1992).

2.2. RECETTORI A_{2A}

2.2.1 Struttura molecolare, funzione e localizzazione nel SNC

Il recettore A_{2A} è una glicoproteina di circa 45 kDa estremamente conservata, avendo un'omologia del 90% tra i differenti organismi. Il recettore è costituito da sette domini idrofobici transmembrana, estesi loop intracitoplasmatici ed extracitoplasmatici, presenta l'estremità NH₂-terminale esterna e quella COOH-terminale interna (Ijzerman et al., 1994; Kim et al., 1995). Il recettore è associato, mediante il II e III loop intracitoplasmatico, a proteine G_s (Moreau e Huber, 1999) che stimolano l'adenilato ciclasi aumentando le concentrazioni intracellulari di cAMP (Moreau e Huber, 1999). Il cAMP può, come secondo messaggero, inibire le MAPK (Hirano et al., 1996) e attivare la PKA (Gubitz et al., 1996), la quale è in grado, a sua volta, di fosforilare i canali del Ca²⁺ di tipo P modulando direttamente i meccanismi di rilascio di vescicole. L'attività esocitotica può essere regolata anche dalle stesse subunità βγ della proteina G_s, le quali intervengono sui canali del Ca²⁺ di tipo N mediante un meccanismo di fosforilazione mediato da PKC (Gubitz et al., 1996; Gonçalves et al., 1997). L'aumento di cAMP sembra giocare un ruolo di rilievo anche nei fenomeni infiammatori poiché induce un aumento dell'espressione delle ciclossigenasi-2 (COX-2) e la sintesi di prostaglandine (PGE-2) (Fiebich et al., 1996).

L'attivazione dei recettori A_{2A} determina un effetto eccitatorio sulla neurotrasmissione (Latini et al., 1996), azione esercitata sia a livello del SNC (Pedata et al., 1984; Brown et al., 1990) che del SNP (Correia-de-Sà, 1991).

La stimolazione dei recettori A_{2A} promuove il rilascio di glutammato in condizioni normossiche ed ischemiche (Corsi et al., 1999, 2000; O'Regan et al., 1992; Popoli et al., 1995; Simpson et al., 1992). L'aumento della corrente di aminoacidi eccitatori dopo l'ischemia è il primo evento di una cascata eccitotossica che porta alla morte cellulare (Bruce-Keller, 1999), perciò la riduzione della corrente di glutammato o la diminuzione della sensibilità dei recettori glutammatergici sono considerati importanti per la neuroprotezione. In topi knock-out per il recettore A_{2A} è stata dimostrata una riduzione del danno ischemico cerebrale in un modello *in vivo* di ischemia transiente (Chen et al., 1999). Antagonisti selettivi dei recettori A_{2A} si sono mostrati neuroprotettivi in vari modelli di ischemia (Melani et al., 2003; Monopoli et al., 1998) e di eccitotossicità, *in vivo* (Jones et al., 1998), riducendo la liberazione di glutammato nelle prime ore dopo l'evento ischemico (Marcoli et al., 2003; Pedata et al., 2005). È noto inoltre il ruolo di adenosina nei fenomeni di apprendimento e di plasticità sinaptica: la long-term potentiation (LTP), una forma di plasticità sinaptica associata alla memoria, è aumentata dall'attivazione dei recettori A_{2A} (Almeida et al., 2003), infatti è stata osservata nel topo knock-out per il recettore A_{2A} una LTP diminuita nel nucleus accumbens (d'Alcantara et al., 2001).

I recettori A_{2A} sono espressi in tutto il SNC (Dixon et al., 1996), in modo più marcato nello striato, principalmente nel caudato-putamen, nel nucleus accumbens e nei tubercoli olfattori (Jarvis e Williams, 1989; Rosin et al., 1998). Sono espressi sui neuroni ed anche a livello delle cellule microgliali (Fiebich et al., 1996), sugli astrociti (Biber et al., 1999; Lee et al., 2003) e oligodendrociti (Stevens et al., 2002).

2.2.2 Farmacologia

Agonisti. La maggior parte degli agonisti dei recettori A_{2A} sono ottenuti a partire dalla molecola di adenosina per sostituzione dell'anello purinico in posizione 2 o anche per sostituzioni a livello dell'anello di ribosio. La sostituzione di un gruppo alchilamide in posizione 5' sull'anello di ribosio ha permesso di sintetizzare l'agonista non selettivo NECA (5'-N-adenosina etilcarbossammide). Con lo stesso approccio è stato ottenuto CGS21680, agonista moderatamente selettivo nel ratto ma non nell'uomo (Fredholm et al., 2001; Gao et al., 2003), avente minore affinità per il

recettore A_{2A} rispetto a ATL-146e, agonista selettivo. Il composto DPMA N⁶-[2-(3,5-dimetossifenil)-etil], invece, è ottenuto per sostituzione in posizione N6 (Bridges et al., 1988).

Antagonisti. Molti degli antagonisti dei recettori A_{2A} fanno parte del gruppo delle metilxantine e sono stati sviluppati a partire da caffeina. DPMX (3,7-dimetil-1-propilxantine) e 8-cicloexilcaffeina sono composti con scarsa selettività (Williams, 1991), mentre CSC (8-(-3-clorostiril)-caffeina) (Jacobson et al., 1993a) e KF17837 (Nonaka et al., 1994) sono più selettive ma meno facili da utilizzare poiché vanno incontro a fenomeni di fotoisomerizzazione. Antagonisti selettivi molto potenti sono ZM241385 e SCH58261 (Palmer et al., 1996; Baraldi et al., 1998), quest'ultimo però non deriva dalle xantine, come anche CP66713 che invece fa parte del gruppo del pirazolo [4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c] pirimidine e presenta comunque una discreta selettività per i recettori A_{2A} (Sarges et al., 1990).

2.3. RECETTORI A_{2B}

2.3.1 *Struttura molecolare, funzione e localizzazione nel SNC*

Il recettore A_{2B} è una glicoproteina di circa 36-37 kDa ed è accoppiato a proteine G_s che stimolano l'adenilato ciclasi e la PKC.

I recettori A_{2B} sembrano indurre in corteccia di ratto rilascio di aminoacidi eccitatori e acetilcolina, mentre riducono il rilascio di acido γ -ammino butirrico (GABA) (Phillis et al., 1993) ed inoltre modulano il processo di LTP nell'ippocampo di ratto (Kessey et al., 1997). Le vie di segnalazione prodotte dalla stimolazione dei recettori A_{2B} sono fortemente influenzate dalle correnti di segnale di altri recettori che influiscono sulla PLC- Ca^{2+} -PKC. In fettine cerebrali l'accumulo di cAMP, dovuto all'attivazione dei recettori A_{2B} , è marcatamente aumentato da farmaci che stimolano la PKC (Hollingsworth et al., 1985; Fredholm et al., 1987; Nordstedt e Fredholm, 1987).

I recettori A_{2B} sono espressi sia a livello del SNC, dove però si trovano ad una densità piuttosto bassa, con una prevalenza sui neuroni ippocampali (Mogul et al.,

1993; Kessey et al., 1997) e sulle cellule gliali (Peakman e Hill, 1994; Fiebich et al., 1996), sia a livello del SNP.

2.3.2 Farmacologia

Agonisti. Tra gli agonisti sintetizzati i più importanti sono LUF5834 (Beuchers et al., 2004) e BAY60-6583 (Kuno et al., 2007; Eckle et al., 2008), altamente selettivo.

Antagonisti. Gli antagonisti selettivi sono sintetizzati a partire da xantine e comprendono MRS1454, MRE 2029-F20 e OSIP339391 (Kim et al., 2001; Gessi et al., 2005; Stewart et al., 2004).

2.4. RECETTORI A₃

2.4.1 Struttura molecolare, funzione e localizzazione nel SNC

I recettori A₃ sono accoppiati a proteine G_i, capaci di inibire l'adenilato ciclasi (Zhou et al., 1992) e stimolare la PLC (Abbracchio et al., 1995), sono coinvolti nella mobilitazione del calcio (Englert et al., 2002; Fossetta et al., 2003; Shneyvays et al., 2004, 2005) e stimolano la conduttanza al potassio (Trussel e Jackson, 1985).

I recettori A₃ interagiscono con le MAPK (Schulte e Fredholm, 2003). Gli studi riguardanti il ruolo dei recettori A₃ per adenosina nella patofisiologia dell'ischemia cerebrale hanno prodotto risultati controversi. La stimolazione dei recettori A₃ presinaptici presenti nell'ippocampo di ratto (Lopes et al., 2003) produce un effetto eccitatorio sulla trasmissione sinaptica; la loro attività nell'ippocampo *in vitro* è sempre attenuata dall'inibizione presinaptica causata dai recettori metabotropi del glutammato, dovuta ad un meccanismo PKC-dipendente (Macek et al., 1998). In condizioni ischemiche *in vivo* e *in vitro* le alte concentrazioni extracellulari di adenosina sono in grado di attivare i recettori A₃ contribuendo alla cascata di segnali che portano alla morte neuronale (Von Lubitz, 1999; Pugliese et al., 2003). Questi risultati sono compatibili con l'osservazione che la somministrazione acuta di un agonista selettivo per i recettori A₃ aggrava il danno derivante da ischemia nel gerbillo (Von Lubitz et al., 1994a). Al contrario, è stato dimostrato che la somministrazione

cronica preischemica di un agonista dei recettori A_3 protegge contro il danno neuronale ischemico (Von Lubitz et al., 1994b); questo può essere attribuito alla desensitizzazione dei recettori A_3 , infatti essi desensitizzano più rapidamente rispetto agli altri recettori di adenosina (Olah e Stiles, 2000). Studi condotti nel ratto invece hanno dimostrato che, in condizioni ipossiche, l'attivazione selettiva dei recettori A_3 è coinvolta nell'inibizione della neurotrasmissione eccitatoria a livello dei neuroni corticali (Hentschel et al., 2003). Compatibilmente a ciò, topi knock-out per i recettori A_3 mostrano un'aumentata neurodegenerazione in risposta a ripetuti episodi di moderata ipossia (Fedorova et al., 2003). Questi risultati opposti, riguardanti un ruolo eccitatorio o inibitorio svolto dai recettori A_3 in merito all'attività sinaptica in condizioni di ipossia/ischemia, possono essere spiegati considerando che nelle prime fasi dell'ischemia i recettori A_3 hanno un ruolo neuroprotettivo, in sinergia con i recettori A_1 , mentre una grave ischemia potrebbe trasformare gli effetti mediati dai recettori A_3 da protettivi a dannosi (Pugliese et al., 2006).

I recettori A_3 sono espressi a bassa densità in tutto il SNC, con una specifica distribuzione nell'ippocampo e nel cervelletto (De et al., 1993; Jacobson et al., 1993b).

2.4.2 Farmacologia

Agonisti. Allo scopo di comprendere il ruolo fisiologico del recettore A_3 sono stati utilizzati come sonde farmacologiche gli agonisti IB-MECA e CI-IB-MECA (Jacobson, 1998). L'agonista IB-MECA provoca una depressione dell'attività motoria nel topo (Jacobson et al., 1993b), protegge nel gatto dall'apoptosi indotta dalla riperfusione dopo ischemia (Rivo et al., 2004). Gli agonisti possono indurre o attenuare l'apoptosi a seconda della concentrazione utilizzata: in eosinofili e pro mielociti umani della linea cellulare HL-60 (Kohn et al., 1996; Kim et al., 2002), IB-MECA induce apoptosi a concentrazioni relativamente alte ($>10 \mu\text{M}$), ma nella linea cellulare RBL-2H3 una concentrazione più bassa ($1 \mu\text{M}$) dello stesso composto blocca l'apoptosi indotta da radiazione ultravioletta (Gao et al., 2001). Agonisti particolarmente potenti di questo sottotipo recettoriale possono essere ottenuti mediante la modificazione 4'-tio dei derivati di adenosina, come LJ 568 (Jeong et al., 2003).

Antagonisti. Tra gli antagonisti invece figurano CCPA e DPMA, la cui struttura è stata utilizzata, vantaggiosamente, per ottenere il farmaco MRS1292 che è un antagonista selettivo dei recettori A_3 sia nel ratto che nell'uomo (Gao et al., 2002; Yang et al., 2005). Il recettore A_3 , a differenza di tutti gli altri sottotipi, ha una bassa affinità per le xantine come caffeina e teofillina (Zhou et al., 1992), mentre nell'uomo e nella pecora i recettori A_3 mostrano un'affinità intermedia.

3. ATP

L'adenosina 5'-trifosfato (ATP) (Fig. 4) è la fonte universale di energia per tutti i tipi di cellule.

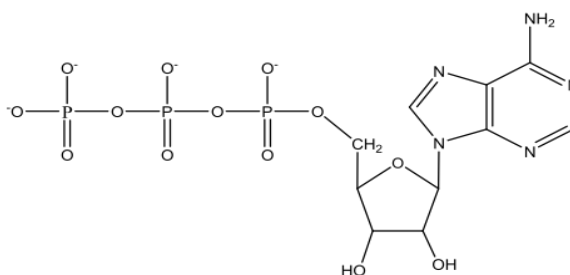


Figura 4. Struttura molecolare di adenosina-5'-trifosfato

Considerato il ruolo fondamentale di ATP a livello intracellulare, è stato per lungo tempo discusso il suo ruolo extracellulare. Drury e Szent-Györgyi (1929) dimostrarono che composti purinici extracellulari avevano un effetto cronotropo negativo sul cuore e inibivano l'attività spontanea della muscolatura liscia intestinale. Tali composti adenosici furono identificati: adenosina, AMP, ADP e ATP. Questi e studi successivi, dimostrarono come, ad un diverso numero di fosforilazioni in posizione 5' sul ribosio, corrisponda una diversa azione della molecola, e che spesso proprio l'ATP evoca una risposta più intensa rispetto a quella degli altri composti adenosinici (Drury, 1936; Moir e Downs, 1972).

Nel 1959 Holton mostrò che, a seguito di una stimolazione antidromica di nervi sensori, veniva rilasciata una quantità di ATP sufficiente a indurre una vasodilatazione delle arterie nell'orecchio di coniglio.

Nel 1972 Burnstock ipotizzò che l'ATP potesse essere un trasmettitore coinvolto nella trasmissione NANC (non-adrenergico non-cholinergico) a livello della muscolatura liscia del tratto gastrointestinale e della vescica. Nel 1976 Burnstock sosteneva che l'ATP potesse essere corilasciato dai terminali sinaptici, insieme ad altri neurotrasmettitori.

3.1 Sintesi

ATP viene sintetizzato da tre vie metaboliche indipendenti: una per la sintesi del ribosio, una per l'adenina e una che lega i tre gruppi fosfato al ribosio. ATP è prodotto in vari cicli metabolici quali la glicolisi anaerobia che prevede la degradazione del glucosio ad acido lattico, il ciclo dell'acido citrico e la fosforilazione ossidativa che prevede l'ossidazione aerobia; il principale regolatore della sintesi di ATP è l'ADP.

3.2 Deposito

Una volta sintetizzato, ATP può essere immagazzinato in vescicole presinaptiche e successivamente rilasciato insieme ad altri neurotrasmettitori a livello dei terminali nervosi (Burnstock, 1976), ma non si esclude che possa essere anche immagazzinato da solo. È stato dimostrato che ATP può essere immagazzinato in vescicole sinaptiche, granuli cromoaffini (Pintor et al., 1992) e granuli densi (Evans et al., 1992; Burnstock, 1997; Sorensen e Novak, 2001). Nelle vescicole colinergiche oltre ad ATP vengono immagazzinati ADP, Ap₄A, Ap₅A e, nei granuli cromoaffini, ADP, UTP, Ap₄A, Ap₅A, Ap₆A (Pintor et al., 1993; Zimmermann, 1994); nei terminali nervosi periferici ATP è immagazzinato nelle vescicole insieme ad acetilcolina (Morel e Meunier, 1981; Reigada et al., 2003) o a noradrenalina (Sesti et al., 2002; Stjarne, 2001).

Tutte le vescicole sinaptiche contengono una pompa protonica simile alla H^+ -ATPasi vacuolare, che pompa protoni nella vescicola rendendo l'interno della stessa più positivo del citosol: tale gradiente elettrochimico guida l'uptake dei neurotrasmettitori mediato da molecole trasportatrici (Kelly, 1993); l'accumulo di amine cariche positivamente e acetilcolina è guidato principalmente dal gradiente protonico, mentre il trasferimento di aminoacidi carichi negativamente come glutammato, glicina e GABA è guidato in gran parte dalla differenza di potenziale di membrana. ATP essendo una molecola negativa è più facilmente accumulata nelle vescicole contenenti acetilcolina o noradrenalina che non con anioni: esempi ben conosciuti di co-immagazzinamento di ATP e acetilcolina nelle vescicole sinaptiche sono l'organo elettrico della Torpedine e la giunzione neuromuscolare (Van der Kloot, 2003).

L'accumulo di ATP nelle vescicole viene mediato da specifici trasportatori ADP/ATP, aventi probabilmente una struttura simile al trasportatore mitocondriale dei nucleotidi. Il trasportatore vescicolare per ATP è stato identificato inizialmente nell'organo elettrico della Torpedine marmorata (Lee e Witzemann, 1983; Luqmani, 1981; Stadler e Fenwick, 1983), si presume che abbia una specificità per il trasporto dei nucleotidi simile a quella dei trasportatori vescicolari di glutammato e glicina, capaci di immagazzinare gli aminoacidi per regolarne poi il rilascio in determinati distretti nervosi (Zimmermann et al., 1993). Il numero di molecole trasportatrici di ATP può raggiungere fino a 50 per singola vescicola, mentre per poter riempire adeguatamente una vescicola sono sufficienti pochi trasportatori per acetilcolina (Van der Kloot, 2003) o addirittura uno soltanto per glutammato (Daniels et al., 2006). Questo suggerisce che il trasportatore per ATP abbia una bassa efficienza e quindi che siano necessarie più molecole trasportatrici per poter riempire la vescicola; allo stesso tempo però, la probabilità di danneggiare tale trasporto è più bassa. La capacità complessiva del trasportatore nucleotidico nelle vescicole di cervello è 400 volte più bassa della capacità di trasporto di glutammato (Gualix et al., 1999).

La concentrazione di ATP dentro le vescicole secretorie è stimata essere 5-500 mM nelle mast-cellule (Bergendorff e Uvnas, 1973; Uvnas, 1974) e 150-200 mM in vescicole contenenti anche serotonina e acetilcolina (Bankston e Guidotti, 1996; Van der Kloot, 2003); nelle vescicole contenenti altri neurotrasmettitori il rapporto delle

due concentrazioni varia, è 2:1 tra serotonina e ATP, mentre è 50:1 tra acetilcolina e ATP (Sperlagh et al., 1997) .

In alternativa, ATP può entrare nelle vescicole per diffusione passiva attraverso canali cationici non specifici (Lange e Brandt, 1993).

3.3 Rilascio

ATP è una molecola biologica ubiquitaria, presente in tutte le cellule e organelli intracellulari, comprese le vescicole secretorie. Il rilascio vescicolare di ATP fu dimostrato per una varietà di cellule, secretorie e non come oociti (Aleu et al., 2003), cellule P12 (Fabbro et al., 2004), cellule epiteliali polmonari (Ahmad et al., 2005), osteoblasti (Romanello et al., 2005), cellule β -pancreatiche e mast-cellule peritoneali (Aspinwall e Yeung, 2005), ma soprattutto dalle cellule neuronali che contengono vescicole sinaptiche, organizzate in clusters, nei pressi della membrana presinaptica (Dowdall et al., 1974; Zimmermann e Denston, 1976).

È stato dimostrato che ATP può essere rilasciato insieme a noradrenalina (Su et al., 1971), acetilcolina (Burnstock et al., 1978), serotonina (Bankston e Guidotti, 1996), GABA (Jo e Schlichter, 1999; Jo e Role, 2002) e glutammato (Pankratov et al., 1998; Mori et al., 2001).

Il processo esocitotico, che si verifica in un arco di tempo compreso nell'ordine dei millisecondi, prevede che si verifichi inizialmente la depolarizzazione della membrana per attivazione di canali al Na^+ , la quale determina un aumento della permeabilità al Ca^{2+} della membrana presinaptica e un influsso di ioni Ca^{2+} attraverso i canali al Ca^{2+} voltaggio-dipendenti: l'incremento della concentrazione intracellulare di ioni Ca^{2+} determina la fusione delle vescicole con la membrana cellulare e il conseguente rilascio del loro contenuto nello spazio extracellulare. In astrociti di ippocampo, ad esempio, è stato dimostrato che si ha rilascio di ATP in seguito ad un aumento della concentrazione interna di ioni Ca^{2+} (Verderio e Matteoli, 2001; Coco et al., 2003), rilascio che risulta invece fortemente attenuato in presenza di chelanti del Ca^{2+} (Coco et al. 2003).

Il rilascio di ATP può essere indotto anche da depolarizzazioni dovute a incremento dello ione K^+ (White, 1978) o in modo indipendente dal Ca^{2+} (White, 1984).

Il rilascio di una singola vescicola può dare origine a concentrazioni extracellulari di ATP di circa 5-500 μM ; la EC_{50} per l'attivazione da parte di ATP di tutti i recettori, omodimeri ed eterodimeri espressi nei neuroni si trova nel range di 1-10 μM (Khakh, 2001; Norenberg e Illes, 2000); perciò l'ATP rilasciato dalle vescicole sinaptiche è sufficiente ad attivare i recettori P2X post-sinaptici.

Oltre all'esocitosi dai terminali presinaptici, il rilascio di ATP nel SNC può avvenire anche per diffusione attraverso larghi pori transmembrana come gli emicanali delle gap-junctions (Fig. 5), canali del Cl^- sensibili al voltaggio o recettori canale P2X₇ (Arcuino et al., 2002; Darby et al., 2003; Lazarowski et al., 2003; Sperlagh et al., 2002; Stout et al., 2002; Suadicani et al., 2006).

Il rilascio non-esocitotico di ATP rimane comunque argomento di studio: potrebbe esser dovuto a carrier o ad un canale simile al prodotto del gene MDR (Multi Drug Resistance), la glicoproteina-P, che è stato recentemente implicato come un canale per ATP (Abraham et al., 1993) visto che nelle cellule che esprimevano tale gene il rilascio di Ca^{2+} era proporzionale all'espressione sulla membrana della glicoproteina-P; in seguito si osservò che anche la proteina canale CFTR (Cystic fibrosis trans membrane conductance regulator) era capace di trasportare ATP (Reisin et al., 1994). Inoltre ATP può essere rilasciato con meccanismi di rilascio citolitici, in seguito cioè a danneggiamento della membrana o morte cellulare (Bodin e Burnstock, 1996), durante i processi necrotici infatti la degradazione degli acidi nucleici costituisce un'ulteriore via di produzione di ATP.

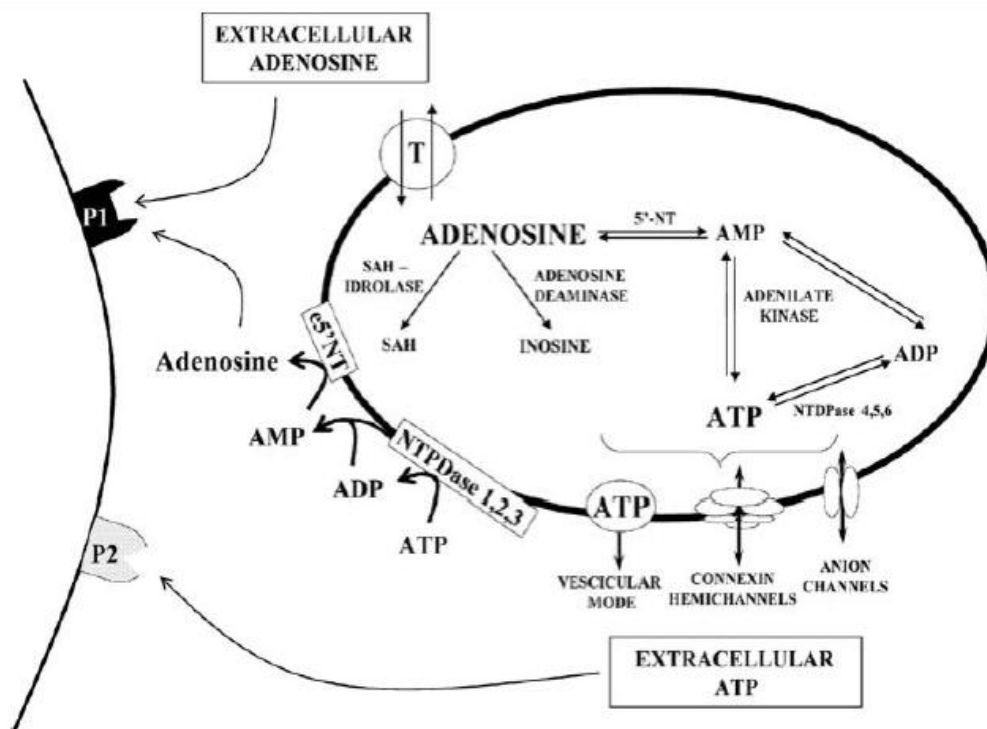


Figura 5. Rappresentazione schematica del metabolismo di ATP. ATP viene sintetizzato intracellularmente e rilasciato dalla cellula per via esocitotica, emicanali di connessina o attraverso canali anionici. Una volta liberato può agire sui propri recettori P2 e poi viene degradato dalle ecto-nucleotidasi di membrana generando ADP, AMP e adenosina, la quale a sua volta può stimolare i recettori P1.

3.4 Catabolismo extracellulare

L'azione extracellulare di ATP sui suoi recettori è fortemente limitata dalla sua idrolisi operata da ecto-nucleotidasi, enzimi di superficie trovati in siti di rilascio di ATP (Zimmermann e Braun, 1999) che portano alla generazione di fosfati liberi o pirofosfati e adenosina, molecola che può modulare la funzione neuronale agendo sui propri recettori (Fig. 5). La velocità con cui viene degradato un quanto di ATP è stimata tra 50 e 100 msec (Stjärne e Stjärne, 1995) e la V_{max} è maggiore per ATP e ADP rispetto a AMP. Tali enzimi interferiscono direttamente con l'attività del nucleotide ma, generando molecole che si comportano anch'esse da neurotrasmettitori, rendono ancora più complessa la neurotrasmissione. Nell'ippocampo di ratto sono stati

dimostrati effetti inibitori da parte di ATP a causa della sua rapida degradazione ad adenosina (<1s) e all'attivazione di recettori A₁ (Dunwiddie et al., 1997; Cunha et al., 1998).

Gli enzimi che degradano le molecole di ATP extracellulari e altri 5'-trifosfati attualmente conosciuti sono: ecto-nucleoside trifosfato difosfoidrolasi (NTPDasi), ecto-pirofosfatasi o fosfodiesterasi (NPPs), 5'-ectonucleotidasi (E-5'-NT o CD73) e le ecto-fosfatasi alcaline (Tabella 1).

Tabella 1. Ecto-nucleotidasi e reazioni catalizzate

Ecto-nucleotidasi	Reazione catalizzata
NTPDasi1	ATP → ADP → AMP
NTPDasi2	ATP → ADP
NTPDasi3	ATP → ADP → AMP
NPP1, 2, 3	ATP → AMP
5'-ectonucleotidasi	AMP → Adenosina
Ecto-fosfatasi alcalina	ATP → ADP → AMP → Adenosina

Tutti i membri della famiglia delle ecto-nucleotidi trifosfato difosfoidrolasi sono enzimi legati alla membrana plasmatica (Fig. 6) e capaci di idrolizzare i 5'-nucleosidi trifosfato e i 5'-nucleosidi difosfato (Ziganshin et al., 1994; Plesner, 1995). Le NTPDasi 1, 2 e 3 si differenziano tra loro per la diversa affinità verso i substrati (Fig. 6): la NTPDasi 1 (o ecto-apirasi, CD39) idrolizza ATP e ADP con un rapporto molecolare che va da 1:0.5 a 1:0.9 (Kaczmarek et al. 1996; Wang e Guidotti 1996; Heine et al. 1999) ed è in grado di degradare anche GTP o UTP; la NTPDasi 2 (ecto-ATPasi o CD39L1), invece, ha una forte preferenza per l'ATP con un rapporto molecolare per ATP e ADP di 1:0.03 o inferiore (Kegel et al. 1997; Kirley 1997; Mateo et al. 1999); la NTPDasi 3 (CD39L3 o HB6) è un intermedio funzionale e mostra un rapporto molecolare tra ATP e ADP di circa 1:0.3 (Smith e Kirley 1998; 1999). Le NPTDasi4-6 sono meno selettive per i nucleotidi e sono localizzate negli organelli intracellulari come nell'apparato di Golgi (Wang e Guidotti, 1998) e sui

nella fase finale, all'idrolisi di ATP (James e Richardson, 1993). Basse concentrazioni di ATP non inibiscono l'enzima e portano ad una rapida formazione di adenosina, mentre alte concentrazioni di ATP bloccano o riducono la produzione del nucleoside (James e Richardson, 1993). La modulazione della formazione di adenosina è di rilevante importanza dal momento che si riflette sui processi di neurotrasmissione. Le 5'-ectonucleotidasi hanno una espressione ubiquitaria nel sistema nervoso centrale e periferico. A livello centrale sono espresse in neuroni e glia: astrociti, oligodendrociti e microglia (Kreutzberg et al., 1978; Schoen e Kreutzberg, 1995).

Anche le ecto-fosfatasi alcalina (ecto-ALP) sono capaci di trasformare AMP in adenosina, ma non è chiaro il loro ruolo nella risposta indotta da ATP e nel metabolismo nucleotidico extracellulare. Le ecto-ALP, come le CD73, sono proteine di membrana ancorate al glicosilfosfatidilinositolo e note per esser localizzate a livello della caveola (Ide e Saito, 1980), che consiste in un microdominio specializzato della membrana plasmatica avente un ruolo in diversi processi di segnalazione cellulare, incluso il sistema di trasduzione del segnale correlato all'adenilato-ciclastasi (Schwencke et al., 1999).

Le molecole di ATP rilasciate vengono degradate da nucleotidasi adese alla membrana, ma è stato dimostrato anche un rilascio di nucleotidasi solubili in associazione col rilascio di ATP (Todorov et al., 1997). Il rilascio di nucleotidasi citosoliche è un processo Ca^{2+} dipendente, ciò fa supporre che tali enzimi siano immagazzinati in vescicole. Dal momento che ATP non viene degradato prima del rilascio, si ipotizza che ATP e le nucleotidasi siano immagazzinati in vescicole separate oppure che, sebbene co-immagazzinati, gli enzimi siano inattivi in condizioni di pH acido quale quello vescicolare e che divengano attivi solo al momento del rilascio.

4. RECETTORI DI ATP

I recettori di ATP sono denominati recettori P2 e vengono suddivisi in due classi principali: - recettori P2X, canali aperti da ligando; - recettori P2Y, accoppiati a proteine G (Abbraccio e Burnstock, 1994; Fredholm et al., 1994).

Burnstock e Kennedy (1985) descrissero i diversi profili farmacologici e le differenti distribuzioni tissutali dei recettori P2 e proposero la nomenclatura P2X/P2Y: i recettori P2X sono attivati dagli analoghi stabili di ATP, α,β -metilene ATP (α,β -meATP) e β,γ -meATP; i recettori P2Y rispondono bene al legame con 2-metil-tio-ATP (2Me-SATP) e poco o niente con α,β -meATP e β,γ -meATP. I recettori P2X sono localizzati nel vas deferens, vescica urinaria e nella muscolatura liscia vascolare dove mediano la contrazione; i recettori P2Y sono stati trovati nelle cellule endoteliali dei vasi di cui mediano il rilasciamento. In seguito furono identificati otto sottotipi recettoriali per P2X e undici per P2Y (Ralevic e Burnstock, 1998). Ulteriori recettori P2 sono stati identificati in vari distretti tissutali e descritti principalmente in base ai loro diversi profili farmacologici:

P2U, attivati ugualmente da ATP e UTP, ampiamente distribuiti; P2T (platelet ADP receptor), mediano l'aggregazione piastrinica; P2Z, trovati nelle mast cellule e linfociti, sono in grado di mediare la citotossicità e la degranulazione (Gordon, 1986; O'Connor et al., 1991); P2S (Wiklund e Gustafsson, 1988), P2R (Von K gelfen et al., 1989), P2D (Pintor et al., 1993), recettori specifici per uridina, detti anche "pirimidinocettori" (Seifert e Schultz, 1989; Von K gelfen et al., 1989). Sono stati descritti anche i recettori P3 (Shinozuka et al., 1988; Forsyth et al., 1991) e P4 (Pintor e Miras-Portugal, 1995).

4.1 RECETTORI P2X

I recettori P2X sono canali ionici aperti dal ligando ATP, che mediano il passaggio rapido (entro i 10 ms) e selettivo di cationi quali Na^+ , K^+ e Ca^{2+} (Dubyak e el-Moatassim, 1993; North, 1996). Sono localizzati su cellule eccitabili come cellule di muscolo liscio, neuroni e cellule gliali, e giocano il ruolo di mediatori della

neurotrasmissione rapida eccitatoria per ATP sia nel sistema nervoso centrale che periferico. Sono stati identificati otto sottotipi recettoriali (Ralevic e Burnstock, 1998), sette dei quali in grado di mediare risposte funzionali (Burnstock e Williams, 2000)

4.1.1 Struttura molecolare, funzione e localizzazione nel SNC

I recettori P2X sono costituiti da tre o sei subunità proteiche (Nicke et al., 1998; Stoop et al., 1999) ciascuna formata da un numero di residui amminoacidici compreso tra 379 (P2X₆) e 595 (P2X₇) (Khakh, 2001); le subunità possono appartenere allo stesso sottotipo o a sottotipi diversi, infatti sono state isolate varie strutture eteromultimeriche, costituite ad esempio da P2X₂/P2X₃ (Radford et al., 1997), P2X₄/P2X₆ (Le et al., 1998) e P2X₁/P2X₅ (Torres et al., 1998a); mentre il recettore P2X₇ è l'unico ad essere stato isolato soltanto nella struttura omomultimerica e non sembra coassemblare con altre subunità (Torres et al., 1999).

Le subunità recettoriali clonate dei recettori P2X hanno dai 379 ai 472 amminoacidi, presentano ciascuna due domini idrofobici che si inseriscono nella membrana in modo da descrivere un poro (TM1 e TM2), un ampio loop idrofilico extracellulare e le estremità NH₂-terminale e COOH-terminale sono intracellulari (Khakh et al., 2001) (Fig. 7). I recettori P2X contengono nella porzione extracellulare 10 residui di cisteina ben conservati, 14 residui di glicina conservati, 3 potenziali siti di N-glicosilazione (Fig. 7) e 9 istidine. Le cisteine formano ponti disolfuro volti a determinare la restrizione strutturale necessaria per l'associazione della funzionalità recettoriale con quella di canale ionico (Ralevic e Burnstock, 1998; Ennion e Evans, 2002; Clyne et al., 2002); i siti di N-glicosilazione (182-185, 239-242, 298-301) sono importanti per la solubilità della porzione extracellulare, per l'espressione del recettore sulla superficie di membrana e per l'azione di ATP sul recettore (Torres et al., 1998b; Hu et al., 2002); i 9 residui di istidina definiscono la sensibilità del recettore a pH e ioni Zn⁺⁺, capaci di potenziare l'attività del canale. Inoltre nel dominio extracellulare del recettore P2X₂ sono stati individuati 2 residui di lisina probabilmente fondamentali per l'azione di ATP in quanto potrebbero costituire il sito di legame di ATP (Jiang et al., 2000).

I recettori P2X vengono distinti nel tipo a rapida desensitizzazione, che desensitizzano in 100-300 ms (P2X₁ e P2X₃), ed in quello a lenta desensitizzazione, che desensitizzano in alcuni secondi (P2X₂, P2X₅, P2X₆ e P2X₇) (Ralevic e Burnstock, 1998). Le due isoforme di P2X₂, P2X_{2(a)} e P2X_{2(b)}, presentano i due diversi tipi di desensitizzazione: il recettore P2X_{2(a)} infatti presenta 9 residui amminoacidici sull'estremità COOH-terminale che sono assenti nella forma P2X_{2(b)}, e che ne determinano una velocità di desensitizzazione 5 volte più lenta di quella di P2X_{2(b)}. Non solo la lunghezza della porzione COOH-terminale ha un ruolo fondamentale nel definire la velocità di desensitizzazione (Smith et al., 1999; Koshimizu et al., 1999), ma anche l'estremità NH₂-terminale, poiché presenta un sito di fosforilazione per le protein-kinasi C (PKC) fondamentale per una lenta desensitizzazione (Surprenant et al., 1995; Ennion et al., 2000; Boue-Grabot et al., 2000); i domini idrofobici invece sono rilevanti per una rapida desensitizzazione, infatti sostituendo i TM in P2X₂ con quelli di P2X₁ ma non il loop extracellulare, il recettore passa dalla forma a lenta desensitizzazione a quella rapida (Werner et al., 1996). I recettori P2X₇ non cambiano la loro selettività al ligando anche in seguito a lunghe esposizioni ad ATP (Surprenant et al., 1996).

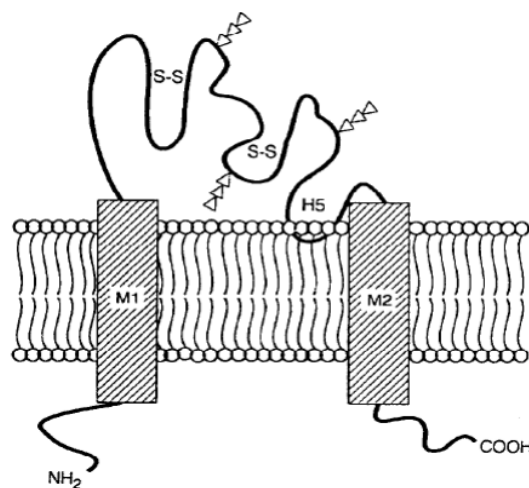


Figura 7. Struttura del recettore P2X₂. Le estremità NH₂ e COOH-terminali sono intracellulari; due domini idrofobici attraversano lo strato lipidico (M1 e M2) e sono connessi da un segmento idrofilico extracellulare di 270 amminoacidi: tale segmento mostra due loop legati da ponti disolfuro (S-S) e tre siti di N-glicosilazione (triangoli).

Il canale cationico descritto dai recettori P2X permette il passaggio di ioni quali Na^+ , K^+ e Ca^{2+} determinando una rapida depolarizzazione di membrana; l'influsso di ioni Ca^{2+} dovuto all'apertura del recettore-canale induce l'attivazione dei canali al Ca^{2+} voltaggio-dipendenti con un conseguente incremento della concentrazione citoplasmatica di ioni Ca^{2+} . Questa via di trasduzione risulta essere molto veloce ed è importante per rapide vie di segnalazione neuronali e per la contrazione muscolare (Ralevic e Burnstock, 1998).

A livello presinaptico l'azione dei recettori P2X determina un aumento del rilascio di serotonina nell'ippocampo di ratto (Okada et al., 1999) e di glutammato nelle afferenze primarie sensoriali del midollo spinale (Nakatsuka e Gu, 2001). A livello postsinaptico i recettori P2X inducono una corrente depolarizzante nei neuroni CA1 (Pankratov et al., 1998) e nei neuroni CA3 (Mori et al., 2001) dell'ippocampo svolgendo un ruolo importante nella LTP, quindi nei processi di memoria e apprendimento (Wieraszko e Ehrlich, 1994).

I recettori P2X_7 presenti nella microglia e nei macrofagi sono coinvolti nel rilascio di citochine proinfiammatorie quali interleuchina (IL) -1α , IL- 1β (Griffiths et al., 1995), IL-6 (Ferrari et al., 1997; Sanz e Di Virgilio, 2000; Le Feuvre et al., 2002); la stimolazione di questo sottotipo recettoriale attiva le caspasi 3 e 6 (Ferrari et al., 1999), modulando così processi apoptotici o necrotici (Le Feuvre et al., 2002). In condizioni fisiopatologiche è responsabile di rigonfiamento e vacuolizzazione cellulare, morte per necrosi o apoptosi (Dubyak e el-Moatassim, 1993).

I recettori P2X_1 , insieme ai recettori P2X_7 , sembrano coinvolti nell'apoptosi, nello sviluppo cerebrale e nel rimodellamento dei circuiti in seguito a traumi e ischemia. ATP stimolando i recettori P2X_1 e P2X_7 garantirebbe l'eliminazione delle cellule danneggiate in maniera irreversibile, limitando la morte cellulare e la liberazione dei contenuti cellulari come i mediatori neurotossici, nei cervelli infartuati (Neary et al., 1996): i recettori P2 in questo modo limiterebbero i processi infiammatori e la necrosi tissutale.

I recettori P2X sono distribuiti uniformemente in tutto il SNC di ratto (Kanjhan et al., 1999), ma in misura maggiore in corteccia, ippocampo, abenula pars compacta, nuclei ipotalamici ventromediali e arcuati (Xiang et al., 1998), nuclei sopraottici e paraventricolari (Loesch et al., 1999), nucleo trigemino mesencefalico, medulla

ventrolaterale e nel complesso vagale dorsale (Atkinson et al., 2000). I recettori P2X₃ sono presenti nei gangli delle corna dorsali (Chen et al., 1995; Lewis et al., 1995) e nel cervello, dove sono coinvolti nella trasmissione del dolore (Vulchanova et al., 1996; 1998). I sottotipi P2X₁₋₆ sono localizzati prevalentemente nei neuroni, mentre i P2X₇ sono presenti nella microglia attivata, nei linfociti, nei macrofagi e nell'astroglia, dove potrebbero svolgere un ruolo nella riparazione del danno a seguito di infiammazione, infarto o insulto immunitario (Di Virgilio et al., 1999; Ferrari et al., 1999). I recettori P2X₇ sono anche presenti nelle fibre presinaptiche eccitatorie, ma non in quelle inibitorie, del midollo spinale dove possono modulare il rilascio di neurotrasmettitori (Deuchars et al., 2001; Sperlagh et al., 2002).

4.1.2 Farmacologia

L'affinità dei recettori P2X per ATP è diversa in base al sottotipo recettoriale, questi recettori vengono perciò distinti in tre classi (Dubyak et al., 1996): recettori ad alta affinità per ATP ($EC_{50}=1\mu M$) e a rapida attivazione e desensitizzazione P2X₁ e P2X₃; recettori a bassa affinità per ATP ($EC_{50}=10\mu M$) e a lenta desensitizzazione P2X₂, P2X₄, P2X₅ e P2X₆; recettore P2X₇ ad affinità molto bassa per ATP ($EC_{50}=300-400\mu M$) e a desensitizzazione molto lenta o nulla (Burnstock e Williams, 2000).

Agonisti. Oltre ad ATP, i diadenosina-polifosfati, composti che presentano una catena di residui fosfato maggiore o uguale a tre (Hoyle et al., 1989; Hoyle, 1990; Bo et al., 1994; Bailey e Hourani, 1995; Ralevic et al., 1995; Usune et al., 1996) sono agonisti naturali. I diadenosina-polifosfati, rispetto all'ATP, presentano una maggiore attività sui recettori P2X₁, probabilmente perché hanno una maggiore resistenza alla degradazione da parte delle ecto-nucleotidasi (Hoyle, 1990; Ralevic et al., 1995).

Gli agonisti di sintesi invece sono ricavati dalla modificazione di ATP, come α,β -meATP e β,γ -meATP e sono generalmente inattivi sui recettori P2Y (Ralevic e Burnstock, 1998). Questi agonisti agiscono prevalentemente sui sottotipi P2X₁ e P2X₃, a rapida desensitizzazione (Ralevic e Burnstock 1998), mentre non sono sensibili i recettori P2X₂, P2X₄, P2X₅ e P2X₆, a lenta desensitizzazione (Collo et al., 1996; Evans et al., 1995).

Il Benzoyl ATP (BzATP) è il più potente agonista per i recettori P2X₇, in molte cellule è 10-100 volte più potente di ATP (Erbe et al., 1990; el-Moatassim e Dubyak, 1992; Soltoff et al., 1992; McMilliam et al., 1993; Nuttle et al., 1993).

E' stato evidenziato che gli ioni zinco incrementano la conduttanza del canale della maggior parte dei recettori P2X (Cloues et al., 1993; Cloues, 1995; Li et al., 1993; 1996; Koizumi et al., 1995) ad eccezione del recettori P2X₇, dove al contrario lo zinco ha un effetto inibitorio, mentre il rame ne incrementa l'attività (Virginio et al., 1997).

Anche un pH acido aumenta la conduttanza del canale e a pH 6.5 si può ottenere la massima attività dell'ATP, mentre a pH 8.0 si nota una significativa riduzione della sua attività (King et al., 1996). Questa osservazione è molto importante in alcune condizioni patofisiologiche, come fenomeni infiammatori o di danno, nelle quali si può avere un notevole cambiamento di pH extracellulare (Ralevic e Burnstock, 1998).

Antagonisti. Suramina ed i suoi derivati sono antagonisti non selettivi per i recettori P2X: piridossal-fosfato-6-azophenyl-2',4'-disolfonato (PPADS), Reactive blue 2 (RB2) e Reactive red.

Il TNP-ATP (trinitrofenil-adenosina trifosfato) è un antagonista reversibile e non competitivo dei recettori P2X₂ e P2X₃ e l'IP₅I (P⁵-di[inosina-5'] pentafosfato) è un antagonista dei recettori P2X₁ (Burnstock e Williams, 2000).

Il DIDS (4,4'-diisotiocianato-stilbene-2,2'-disulfonato), bloccante del trasportatore del cloruro, è un antagonista non competitivo e pseudo reversibile dei recettori P2X, con particolare affinità per i recettori P2X₁ (Ralevic e Burnstock, 1998).

L'attività dei recettori può essere modulata anche dall'azione dei cationi: in soluzione gli ioni Ca²⁺ e Mg²⁺ si legano con ATP⁴⁻, generando MgATP²⁻ e CaATP²⁻, riducendo così la quantità di ATP⁴⁻ e l'attività del ligando. Il catione può agire, infatti, come effettore allosterico negativo o può direttamente ostruire il canale, si ha, quindi, un'interazione catione-recettore, piuttosto che un'interazione catione-ligando, come dimostra la maggiore inibizione del recettore P2X₂ rispetto al recettore P2X₁, in presenza di ioni Ca²⁺ (Nakazawa e Hess, 1993; Evans et al. 1996; Li et al. 1997).

4.2 RECETTORI P2Y

I recettori P2Y sono una famiglia di recettori accoppiati a proteine G di membrana. Finora sono stati clonati undici sottotipi recettoriali differenti (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₃, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₈, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄, P2Y₁₅) (Ralevic e Burnstock, 1998), sei dei quali (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂) capaci di mediare risposte funzionali (Burnstock e Williams, 2000); solo di recente è stato clonato un ulteriore sottotipo, il recettore P2Y₁₅ (Inbe et al., 2004).

4.2.1 Struttura molecolare, funzione e localizzazione nel SNC

I recettori P2Y sono accoppiati a proteine G di membrana e presentano la tipica struttura con 7 domini transmembranari (TM) con l'estremità NH₂-terminale intracellulare, l'estremità COOH-terminale extracellulare (Fig. 8) e un numero di residui amminoacidici che va da 308 a 377 con omologia di sequenza del 28%-62% tra i vari sottotipi recettoriali (Ralevic e Burnstock, 1998).

I domini idrofobici TM3, TM6 e TM7 sono coinvolti nell'interazione elettrostatica tra il sito di legame ed ATP (Van Rhee et al., 1995; Jacobson et al., 1999); i loop extracellulari 2 e 3 presentano ponti disolfuro essenziali per l'attività del canale (Hoffman et al., 1999).

I recettori P2Y₁₂ sono accoppiati a proteine G_{i/o} mentre i recettori P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₆ sono accoppiati a proteine G_{q/11} (Ralevic e Burnstock, 1998; Hollopeter et al., 2001); i recettori P2Y possono modulare in maniera differente l'attività di canali al Ca²⁺ e al K⁺ attraverso proteine G diverse (Filippov et al., 2000).

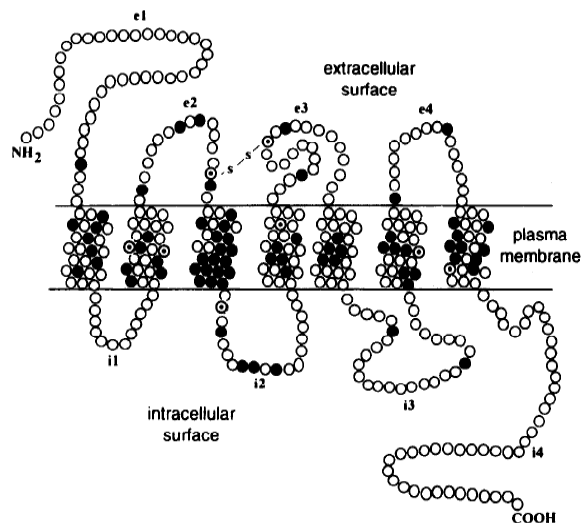


Figura 8. Rappresentazione schematica della sequenza del recettore P2Y₁ in cui sono evidenziate le sue differenze rispetto ai recettori P2Y₂ e P2Y₃. I cerchi neri rappresentano i residui amminoacidici conservati nei tre recettori, i cerchi bianchi i residui non conservati e i cerchi con un punto centrale rappresentano i residui importanti per l'associazione del recettore con la proteina G. (Modificato da Barnard et al., 1994).

La principale via di trasduzione del segnale dei recettori P2Y, accoppiati a proteine G_{q/11} e a G_{i/o} è l'attivazione rispettivamente della fosfolipasi C (PLC) e della PLC β_2 , che portano alla formazione di diacilglicerolo (DAG) e inositolo 1,3,5-trisfosfato (IP₃) con conseguente mobilitazione di ioni Ca²⁺ che può attivare una varietà di vie di segnalazione che comprendono protein-kinasi C (PKC), fosfolipasi A₂ (PLA₂), canali al K⁺ Ca²⁺-dipendenti, oppure la ossido nitrico sintetasi (NOS) con conseguente formazione dei fattori rilassante (EDRF) e iperpolarizzante derivati dall'endotelio (EDHF).

I recettori P2Y inoltre diminuiscono la corrente di Ca²⁺ (I_{Ca}) attraverso i canali del Ca²⁺ voltaggio dipendenti interagendo con canali localizzati dallo stesso lato della membrana; tale interazione può avvenire direttamente, senza secondi messaggeri diffusibili (Hille, 1994), mediante la subunità $\beta\gamma$ delle proteine G_{i/o} e G_{q/11} a cui sono associati (Zamponi e Snutch, 1998). La proteina G_{q/11}, mediante la subunità α (Kammermeier et al., 2000; Haley et al., 2000) induce un'ulteriore riduzione della conduttanza dello ione Ca²⁺ (I_{Ca}) e dell'attività di canali al K⁺ di rettificazione in uscita (Hille, 1994; Filippov et al., 2000). L'inibizione della I_K è mediata dall'attivazione della PLC β (Suh e Hille, 2002) e da un incremento della concentrazione di Ca²⁺

intracellulare IP_3 -dipendente (Selyanko e Brown, 1996; Filippov et al., 1999); la riduzione di I_K provoca depolarizzazione con conseguente aumento del potenziale d'azione, mentre la riduzione di I_{Ca} è coinvolta nell'inibizione presinaptica del rilascio di neurotrasmettitori (Boehm e Kubista, 2002).

I recettori P2Y espressi negli astrociti, P2Y₁ e P2Y₂, intervenendo sull'enzima PLA₂, mediano la mobilitazione di acido arachidonico e rilascio di prostanoidi (Neary et al., 1988; Neary et al., 1991) e attivano le MAP-kinasi (MAPK) (Neary e Zhu, 1994), enzimi coinvolti nei processi di proliferazione, differenziazione e risposte allo stress (Davis, 1993; Avruch et al., 1994).

Nella corteccia prefrontale i recettori P2Y postsinaptici localizzati nella regione somato-dendritica dei neuroni piramidali del V strato sono capaci di potenziare la conduttanza del recettore ionotropico per il glutammato N-metil-D-aspartato (NMDA) ma non di acido α -ammino-3-idrossil-5-metil-4-isoxazolo propionico (AMPA) (Wirkner et al., 2002). I recettori NMDA infatti sono regolati da fosforilazioni, contengono sequenze consenso per la fosforilazione operata da protein-kinasi (Moss e Smart, 1996) come PKC o calmodulina-kinasi II, enzimi candidati al meccanismo di trasduzione dei recettori P2Y.

Alcuni recettori P2Y, associati a proteine G_s (Harden, 1997; Boyer et al., 2000; Communi e Boeynaems, 1997) possono indurre allungamento dei neuriti (Recklies et al., 1974) aumentando i livelli di cAMP. I recettori P2Y possono avere quindi un effetto trofico diretto sui neuroni, ma possono anche incrementare l'azione di neurotrofine e pleiotropine (Neary et al., 1996). I recettori P2Y mediano, quindi, una segnalazione lenta sia a livello di cellule neuronali che di cellule non neuronali (Neary et al., 1988; Salter e Hicks, 1995).

I recettori P2Y sono espressi sia in cellule neuronali che non neuronali del SNC. Il primo recettore ad essere stato clonato dal cervello è il sottotipo P2Y₁. Le molecole di mRNA dei recettori P2Y₁ e P2Y₁₁ sono espresse nel cervello in quantità maggiori rispetto ad altri tessuti (Moore et al., 2001). Gli mRNA dei P2Y₁ risultano essere espressi soprattutto nelle regioni dei gangli basali, nello striato, nei nuclei accumbens, putamen e caudato, sono stati invece direttamente isolati nel globus pallidus, in ippocampo, cervelletto e in numerose regioni della corteccia cerebrale (Illes e Ribeiro, 2004). Le molecole di mRNA dei recettori P2Y₁₂ sono espresse nella

glia (Hollopeter et al., 2001), mentre quelle dei recettori P2Y₁₃ nel talamo, nel nucleo caudato, nella substantia nigra, in ippocampo e cervelletto (Communi et al., 2001).

4.2.2 Farmacologia

I recettori P2Y sono suddivisi in base al nucleotide per il quale mostrano affinità e secondo il numero di fosfati che esso presenta (von Kügelgen e Wetter 2000). Un gruppo presenta maggiore affinità per i nucleotidi adenosinici: ADP (P2Y₁ e P2Y₃) (von Kügelgen e Wetter 2000) e ATP (P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃) (Webb et al. 1993, 1996), l'altro presenta, invece, una maggiore affinità per i nucleotidi uridinici: UTP (P2Y₄, P2Y₁₄) (von Kügelgen e Wetter 2000), UDP o UDP-glucosio (P2Y₆, P2Y₁₄) (Abbracchio et al. 2003; Lazarowski et al. 2003). Molti recettori sensibili ai nucleosidi uridinici però, possono essere attivati anche da nucleotidi adenosinici o da inosina trifosfato (ITP), P2Y₂, P2Y₃, P2Y₄, P2Y₈ (von Kügelgen e Wetter 2000). Alcuni recettori P2Y₁ sono debolmente attivati o addirittura insensibili all'ATP, ma risultano fortemente attivati da ADP. Sembra infatti che in base alla densità del recettore, l'ATP possa comportarsi da agonista pieno, da agonista parziale o da antagonista (Ralevic e Burnstock 1998).

Antagonisti. La suramina si comporta da antagonista non competitivo bloccando i recettori P2Y₁, P2Y₂, P2Y₃, P2Y₆ e P2Y₁₁ (von Kügelgen e Wetter, 2000). PPADS è un antagonista non selettivo e lentamente reversibile capace di bloccare il recettore P2Y₄ (Collo et al., 1996) e si comporta da antagonista competitivo anche sui recettori P2Y₁ e P2Y₆ (Boyer et al., 1994; von Kügelgen e Wetter, 2000). RB2 è un antagonista non competitivo per i recettori P2Y₃, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁ (von Kügelgen e Wetter, 2000) e le ecto-nucleotidasi (Stout e Kirley, 1995).

5. ISCHEMIA CEREBRALE

L'ischemia cerebrale rappresenta la terza causa di morte nei paesi industrializzati, con circa il 30% di mortalità entro il primo anno e il 20% di subentrata invalidità permanente. Si tratta di un evento acuto dovuto a una riduzione transiente o

permanente del flusso ematico nelle zone irrorate da una delle maggiori arterie cerebrali. Tale riduzione può essere dovuta alla formazione di un embolo, di un trombo locale o per danni aterosclerotici che inducono un progressivo restringimento del lume vascolare, oppure per rottura di un vaso. L'ischemia cerebrale determina la morte neuronale e le conseguenze di questa patologia si possono riscontrare nella perdita di funzioni motorie, sensoriali e/o cognitive. L'entità dell'ischemia dipende da quanto viene ridotto il flusso di sangue cerebrale (CBF), poiché questo determina il grado di privazione di ossigeno e glucosio alle cellule. Il cervello è costituito da un tessuto particolarmente vulnerabile all'ischemia a causa dell'elevata sensibilità alle variazioni del flusso sanguigno e della forte dipendenza da un apporto ematico continuo (Hossmann, 1998).

Il termine ischemia cerebrale comprende tutte le manifestazioni cliniche legate al deterioramento, acuto o cronico, della funzione cerebrale e che riconoscono, come meccanismo eziopatologico, un deficit perfusivo-nutrizionale dell'encefalo.

L'ischemia cerebrale si distingue in acuta, cronica e sequela della forma acuta.

La forma acuta è caratterizzata dall'improvvisa e marcata ipoperfusione in una determinata area cerebrale generalmente legata ad atero-trombosi, embolie o emorragia. L'ischemia cerebrale cronica è invece il danno ischemico cerebrale che si instaura lentamente e cronicamente nel tempo, interessando fisiopatologicamente soprattutto i vasi di scambio (microangiopatia cerebrale) dando il quadro clinico della demenza senile.

L'ischemia cerebrale sequela della forma acuta (spesso indicata erroneamente come ischemia cerebrale cronica, poiché non è espressione di un cronico deficit irrorativo dell'encefalo) comprende quelle manifestazioni sindromiche che sono legate alla stabilizzazione periferica del danno neuronale centrale determinato da un'ischemia cerebrale acuta.

L'area colpita dall'infarto cerebrale acuto viene detta "core ischemico" ed è circondata da zone di moderata ischemia che prendono il nome di "penumbra" (Fig. 9), le quali rimangono metabolicamente attive ma silenti da un punto di vista funzionale di trasmissione elettrica (Astrup et al., 1981). La zona di penumbra può progredire verso l'infarto con il perdurare dello stato ischemico ed il mancato

trattamento farmacologico, quindi lo scopo principale della neuroprotezione è quello di recuperare la zona di penumbra ischemica dalla neurodegenazione irreversibile. L'entità del danno conseguente all'ischemia dipende dalla durata del periodo ischemico, ma anche la riperfusione gioca un ruolo prominente nella distribuzione del danno.

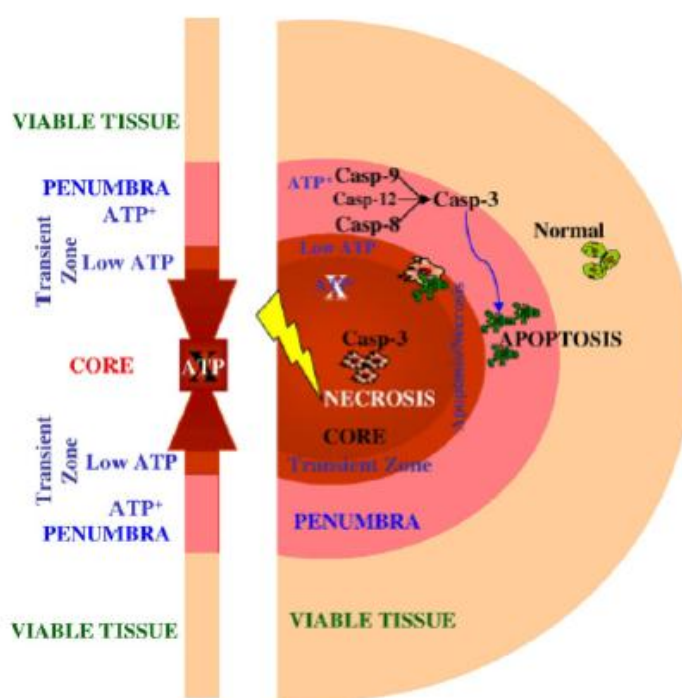


Figura 9. Danno cerebrale durante ischemia. “Core ischemico”, area centrale colpita dall’infarto nella quale le cellule muoiono per necrosi; la zona circostante è chiamata “penumbra”, dove le cellule rallentano il metabolismo per mancanza di ATP e muoiono per apoptosi. Tra queste due regioni vi è la zona transiente, che progredisce a core se il flusso ematico non viene ristabilito entro breve tempo. La zona di penumbra è circondata da tessuto funzionale.

5.1 Patobiologia dell'ischemia

L'ischemia cerebrale innesca una serie di alterazioni emodinamiche, biochimiche e neurofisiologiche correlate a disturbi comportamentali e patologici. Inizialmente, a causa della diminuzione del flusso ematico, vengono colpite le funzioni neurologiche, in seguito col progredire dell'ischemia, l'attività metabolica viene soppressa per poter mantenere l'integrità strutturale delle cellule (Hossmann,

1998), ciò porta all'attivazione di numerose vie di segnalazione che possono essere neuroprotettive o nocive nei confronti del cervello. Questi eventi si verificano simultaneamente e dipendono dall'intensità e dalla durata dell'insulto ischemico, comprendono segnali eccitotossici glutamatergici, squilibri ionici, reazioni di radicali liberi, reazioni infiammatorie e conseguenti eventi a cascata.

5.1.1 Eccitotossicità mediata da glutammato

Il glutammato extracellulare, in condizione fisiologiche, si trova in concentrazioni mantenute nell'ordine micromolare ed è responsabile della generazione del segnale postsinaptico agendo attraverso recettori ionotropi (NMDA, AMPA, kainato), la cui attivazione porta ad un aumento della permeabilità di ioni Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , e recettori metabotropi che mediano le loro azioni tramite proteine G che causano la mobilitazione di ioni Ca^{2+} da riserve intracellulari. In seguito ad ischemia si verifica un eccessivo rilascio di glutammato (Budd, 1998) ed un inadeguato "uptake" di glutammato da parte degli astrociti (Mori et al., 2004; Giffard e Swanson, 2005).

La depolarizzazione peri-infartuale (PID) consiste in onde spontanee di depolarizzazione che si propagano dal core alla zona di penumbra e può essere innescata dal rilascio di glutammato, K^+ o Ca^{2+} in caso di scarsità di energia. Le cellule presenti nel core ischemico subiscono la depolarizzazione anossica e sono destinate a morire, ma quelle della penumbra possono invece depolarizzare e ripolarizzare nuovamente (Hossman, 1996; Ohta et al., 2001). È stato osservato che all'aumentare del numero di depolarizzazioni, l'area infartuata si estende (Mies et al., 1993) ed i farmaci in grado di ridurre il numero di depolarizzazioni sono capaci di limitare anche l'estensione dell'area infartuata (Otha et al., 2001; Lu et al., 2005).

Il calcio regola numerosi processi cellulari ed è anche responsabile del rilascio di neurotrasmettitori, della modulazione dell'eccitabilità di membrana e della regolazione della plasticità sinaptica nel sistema nervoso. La concentrazione di calcio libero presente a livello intracellulare è mantenuta a circa 100 nM, a livello extracellulare è invece intorno ad 1 mM. Il recettore NMDA durante la trasmissione glutamatergica è la via predominante di flusso di ioni Ca^{2+} . I recettori AMPA e kainato sono generalmente coinvolti nella conduttanza del Na^+ , sebbene una

significativa corrente di calcio sia stata osservata anche in alcuni canali AMPA mancanti della subunità GluR2 (Mishina et al., 1991). Il glutammato stimola anche recettori metabotropi che attivano una via di secondi messaggeri che si conclude con il rilascio di calcio intracellulare, tuttavia si pensa che la maggior parte della degenerazione neuronale sia causata dall'intensa esposizione al glutammato che richiede l'attivazione dei recettori NMDA. L'aumento della concentrazione intracellulare di ioni Ca^{2+} conduce all'attivazione di una cascata di processi patobiochimici che portano alla degenerazione neuronale, tra cui l'attivazione di proteasi, di lipasi e di endonucleasi che determinano la rottura della membrana cellulare, del citoscheletro e la frammentazione del DNA.

Un influxo di calcio attraverso i recettori NMDA può determinare anche l'attivazione della nitrossido sintasi (NOS) ed il conseguente rilascio di nitrossido (NO) che può indurre la formazione di radicali liberi (Beckman et al., 1990).

5.1.2 Stress ossidativo

L'ischemia cerebrale e la riperfusione in particolare, sono responsabili dello stress ossidativo dovuto alla formazione di radicali liberi (Nita et al., 2001) che culmina in effetti deleteri (Lewen et al., 2000; Chan, 2001). I radicali sono per la maggior parte le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e comprendono ione superossido (O_2^-), $\text{OH}^\bullet$, perossido di idrogeno (H_2O_2), NO e ONOO^- .

Durante lo stress ossidativo, una rapida sovrapproduzione di radicali liberi si oppone alla capacità detossificante di enzimi antiossidanti quali la superossido-dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), la glutatione perossidasi (GPx), e quella di meccanismi antiossidanti non enzimatici come la vitamina E, C ed il glutatione, causando un immediato danno a proteine cellulari, DNA e lipidi (Sies, 1993; Chan, 2001). Il cervello, a causa della sua elevata concentrazione di lipidi, è molto suscettibile all'insulto mediato dai ROS e l'eccessiva generazione di radicali liberi provoca effetti deleteri sulle funzioni fisiologiche fondamentali per la sopravvivenza. E' stato dimostrato come l'applicazione di enzimi antiossidanti e dei loro composti possano essere efficaci nel combattere lo stress ossidativo (Huang et al., 2001) grazie al loro effetto protettivo nei confronti dell'apoptosi dopo ischemia cerebrale e riperfusione;

infatti SOD svolge un ruolo protettivo nell'ischemia (Noshita et al., 2001; Sugawara et al., 2002) e l'overespressione di SOD1 attenua la morte cellulare dovuta ad apoptosi (Saito et al., 2004). La melatonina è nota per il suo effetto neuroprotettivo grazie alla sua proprietà antiossidante e di eliminazione di radicali liberi, essa infatti previene la perdita neuronale in modelli sperimentali di ischemia (Tan et al., 2000; Pei et al., 2002, 2003).

Lo stress ossidativo prevede numerosi eventi molecolari e biochimici: l'ossidazione della xantina e della ipoxantina operata dall'enzima xantina ossidasi è accompagnata dalla formazione di O_2^- e H_2O_2 , i quali contribuiscono al danno neuronale durante la riperfusione (Nishino e Tamura, 1991; Beetsch et al., 1998); la perossidazione di lipidi di membrana operata dai ROS genera aldeidi tossiche che danneggiano un elevato numero di canali ionici, di trasportatori e di proteine del citoscheletro. Lo stress ossidativo innesca varie cascate di segnali intracellulari che possono avere effetti deleteri sull'omeostasi cellulare. I radicali liberi sono in grado di attivare anche le MAPK (Cao et al., 2005), responsabili di trasmettere i segnali extracellulari al nucleo; gli effetti dannosi mediati dalle MAPK in seguito ad ischemia possono essere ridotti dall'inibizione della loro attività (Wen et al., 2006), che risulta così in neuroprotezione (Namura et al., 2001).

5.1.3 Segnalazione di stress in risposta ad ischemia

L'ischemia cerebrale attiva una complessa serie di cascate di segnale cruciali per il danno o la sopravvivenza cellulare. Una di queste cascate è la via delle MAPK, che svolge un ruolo importante nella regolazione della sopravvivenza in seguito ad ischemia cerebrale (Nozaki et al., 2001). La famiglia delle MAPK consiste in tre membri, chinasi regolata extracellularmente (ERK), p38 e JNK, enzimi attivati in condizioni di stress (Sugino et al., 2000) rilevanti nel danno o sopravvivenza neuronali (Fig. 10).

La neuroprotezione dovuta ad ERK in seguito ad ischemia è mediata dall'attivazione di neurotrofine (NTs), in particolare del fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF) (Han e Holtzman, 2000), il quale influenza la differenziazione e la

sopravvivenza dei neuroni ed è coinvolto anche nella plasticità a breve e lungo termine della sinapsi glutammatergica (Hartmann et al., 2001).

Le chinasi p38 e JNK funzionano come mediatori di stress cellulare in ischemia (Alessandrini et al., 1999; Irving e Bamford, 2002) fosforilando enzimi intracellulari, fattori di trascrizione e proteine citosoliche coinvolte nella sopravvivenza cellulare, e inducendo la produzione di citochine infiammatorie e apoptosi (Xia et al., 1995; Harada e Sugimoto, 1999). Evidenze dimostrano che anche l'inibizione di p38 e JNK ha un ruolo neuroprotettivo in ischemia cerebrale (Barone et al., 2001; Borsellino et al., 2003).

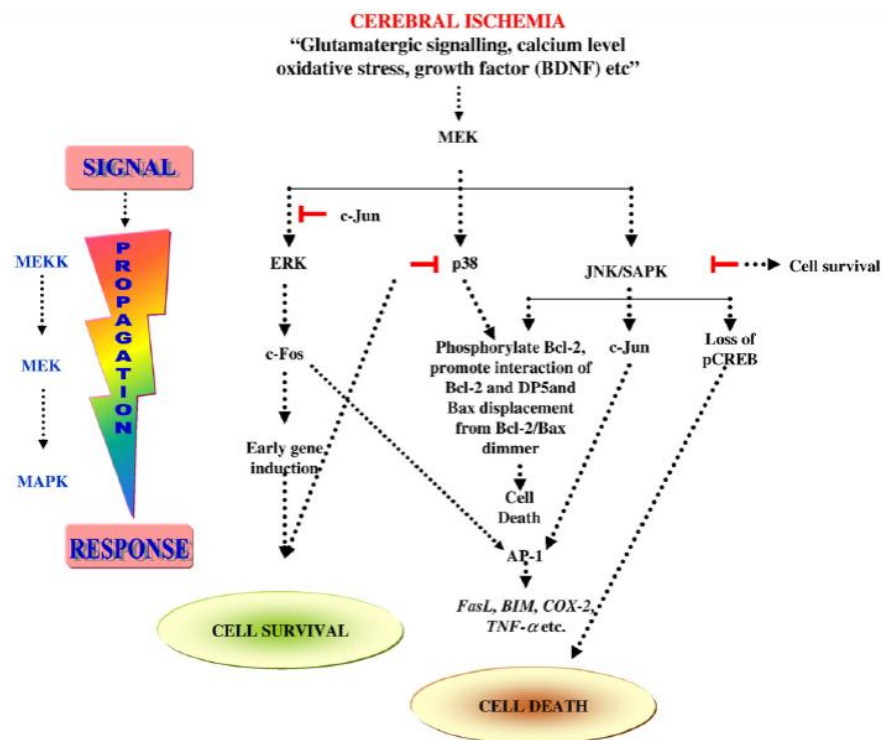


Figura 10. Rappresentazione della cascata delle MAPKs (ERK, p38 e JNK) in ischemia cerebrale e loro ruolo nei meccanismi di sopravvivenza/morte cellulare. Sono rappresentati gli attivatori delle MAPKs (MEK e MEKK), i tre membri principali della famiglia delle MAPKs e le relazioni fra di essi. Lo stimolo viene propagato mediante una serie di fosforilazioni che attivano le MAPKs le quali, a loro volta, fosforilano enzimi intracellulari e fattori di trascrizione.

5.1.4 Reazioni infiammatorie

Poche ore dopo l'instaurarsi dell'ischemia, quando gli eventi infiammatori iniziano nell'interfaccia dei microvasi sanguigni, si ha il passaggio del danno da ischemico ad infiammatorio. La risposta infiammatoria è caratterizzata dall'afflusso di leucociti periferici e dei loro mediatori nel parenchima cerebrale e dall'attivazione della microglia endogena (Morioka et al., 1993; Hallenbeck, 1996; Becker, 1998; Davies et al., 1998; Zheng e Yenari, 2004). Dopo 4-6 ore dall'inizio dell'ischemia, i leucociti circolanti aderiscono alle pareti del vaso, infiltrano e concorrono così all'accumulo nel tessuto ischemico cerebrale di mediatori pro infiammatori o determinandone il rilascio. I neutrofili sono il primo sottotipo di leucociti reclutati nel cervello ischemico e possono aumentare il danno in seguito alla secrezione di sostanze deleterie o di altri mediatori infiammatori (Hallenbeck, 1996). Inibire l'infiltrazione dei neutrofili riduce significativamente il volume dell'infarto, in ischemia (Bowes et al., 1995; Clark et al., 1995; Chopp et al., 1996; Connolly et al., 1996; Yenari et al., 1998; Garau et al., 2005). In seguito ad occlusione permanente dell'arteria cerebrale media nel ratto, i linfociti, dopo i neutrofili, sono presenti a livelli più elevati nella lesione ischemica (Stevens et al., 2002; Li et al., 2005) ed esercitano azioni proinfiammatorie e dannose per il tessuto (Nadareishvili et al., 2004).

Le molecole di adesione possono rappresentare importanti bersagli terapeutici poiché giocano un ruolo fondamentale nell'infiltrazione dei leucociti nel parenchima cerebrale dopo ischemia (Sughrue et al., 2004). L'interazione tra leucociti ed endotelio vascolare è mediata da tre gruppi di molecole di adesione: le selettine (P, E e L), le immunoglobuline (molecole di adesioni intracellulare ICAM-1,2 e molecole di adesione delle cellule vascolari VCAM-1) e le integrine (CD11a-c) (De Graba, 1998; Emsley e Tyrrell, 2002). Alcuni studi hanno dimostrato che l'inibizione dell'adesione di leucociti operata bloccando varie molecole di adesione, determina una riduzione del danno neurologico (Clark et al., 1995; 1997). Le selettine risultano essere upregolate dopo l'ischemia e riperfusione (Okada et al., 1994; Huang et al., 2000), e anche l'espressione delle ICAM e VCAM è aumentata (Zhang et al., 1995; Shyu et al., 1997). Le citochine sono mediatori dell'infiammazione e sono upregolate nel cervello ischemico espresse da cellule del sistema immunitario ma anche da cellule residenti,

della glia e neuroni (Liu et al., 1994; Sairanen et al., 2001). Interleuchina 1 (IL-1) ed il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α) aggravano il danno ischemico, mentre IL-6, IL-10 e il fattore di crescita trasformante β (TGF- β) possono avere un ruolo neuroprotettivo (Allan e Rothwell, 2001). L'accumulo di calcio che si verifica in seguito ad overattivazione del recettore NMDA determina l'attivazione della PLA₂ e la conseguente via dell'acido arachidonico (Stanimirovic e Satoh, 2000) i cui metaboliti sono potenti mediatori dell'infiammazione post-ischemica nel cervello (Sanchez-Moreno et al., 2004). La microglia esercita un ruolo critico in quanto cellule immunocompetenti e fagocitarie del SNC (Kreutzberg, 1996). Una volta attivate, le cellule della microglia vanno incontro a proliferazione, chemiotassi, alterazioni morfologiche e rilasciano numerose sostanze, alcune delle quali citotossiche, altre citoprotettive (Wood, 1995). Gli astrociti sono noti per la loro capacità di esprimere differenti tipi di mediatori infiammatori come citochine, chemochine e la nitrossido sintasi inducibile (iNOS) (Dong e Benveniste, 2001). In seguito ad ischemia essi si attivano aumentando l'espressione di una specifica proteina astrogliale (GFAP), inoltre partecipano all'infiammazione cerebrale esprimendo il maggior complesso di istocompatibilità (MHC) e stimolando l'espressione di molecole come IL-2 (Dong e Benveniste, 2001).

5.1.5 Morte cellulare in ischemia cerebrale

Le cellule nervose possono andare incontro a morte, per necrosi o per apoptosi, in seguito ad un'eccessiva attivazione dei recettori del glutammato, che comporta un aumento delle concentrazioni intracellulari di calcio, produzione di radicali liberi, danno ai mitocondri o al DNA (Fig. 11). Saranno la severità e la durata dell'ischemia a determinare la morte a cui andranno incontro le cellule: una rapida morte per lisi necrotica, meccanismo principale che si instaura nella fase acuta, oppure un deterioramento più lento e controllato che culminerà nella morte per apoptosi che si verifica prevalentemente nella zona di penumbra.

Il processo necrotico, dovuto alla perdita dell'omeostasi osmotica in risposta ad un trauma fisiologico come ad esempio un'anossia acuta, un'improvvisa mancanza di nutrienti o un estremo danno di tipo fisico o chimico, avviene in modo casuale ed

indiscriminato e solitamente coinvolge un gran numero di cellule del tessuto. Nel core ischemico le cellule vanno incontro a questo processo che è caratterizzato dal fatto che le cellule si gonfiano come se assorbissero acqua (Rathmell e Thompson, 1999), successivamente si rompe la membrana plasmatica con conseguente perdita dei contenuti cellulari nello spazio circostante che determina, inevitabilmente, una risposta infiammatoria.

Il processo apoptotico è la morte cellulare programmata, meccanismo strettamente regolato ed altamente efficiente, responsabile dell'omeostasi di sistemi multicellulari. Il processo è caratterizzato da una serie di cambiamenti morfologici e biochimici distinti e ben definiti (Choi, 1996; Love, 2003; Zhang et al., 2004) che procedono attraverso una serie di tappe evitando rigorosamente la fuoriuscita di contenuti intracellulari potenzialmente dannosi. Gli enzimi dell'apoptosi sono le caspasi, il cui gene viene espresso ad alti livelli durante l'infarto (Dirnagl et al., 1999): sono cisteino proteasi specifiche per aspartato che si trovano inattive sotto forma di zimogeni, e una volta attivate da tagli proteolitici funzionano come enzimi di clivaggio agendo su proteine regolatrici dell'omeostasi cellulare e su proteine di riparazione. Sono state identificate 12 caspasi e quelle che hanno un ruolo predominante nell'apoptosi indotta da ischemia sono le caspasi 1 e 3. La via che porta le cellule alla morte programmata in seguito ad infarto è attivata da una varietà di segnali di morte come la produzione di ROS e TNF, mancanza di fattori di crescita e NTs, danno a livello del DNA, distruzione delle strutture cellulari, rilascio del citocromo c in seguito a danno mitocondriale (MacManus e Linnik, 1997; Chan, 2001).

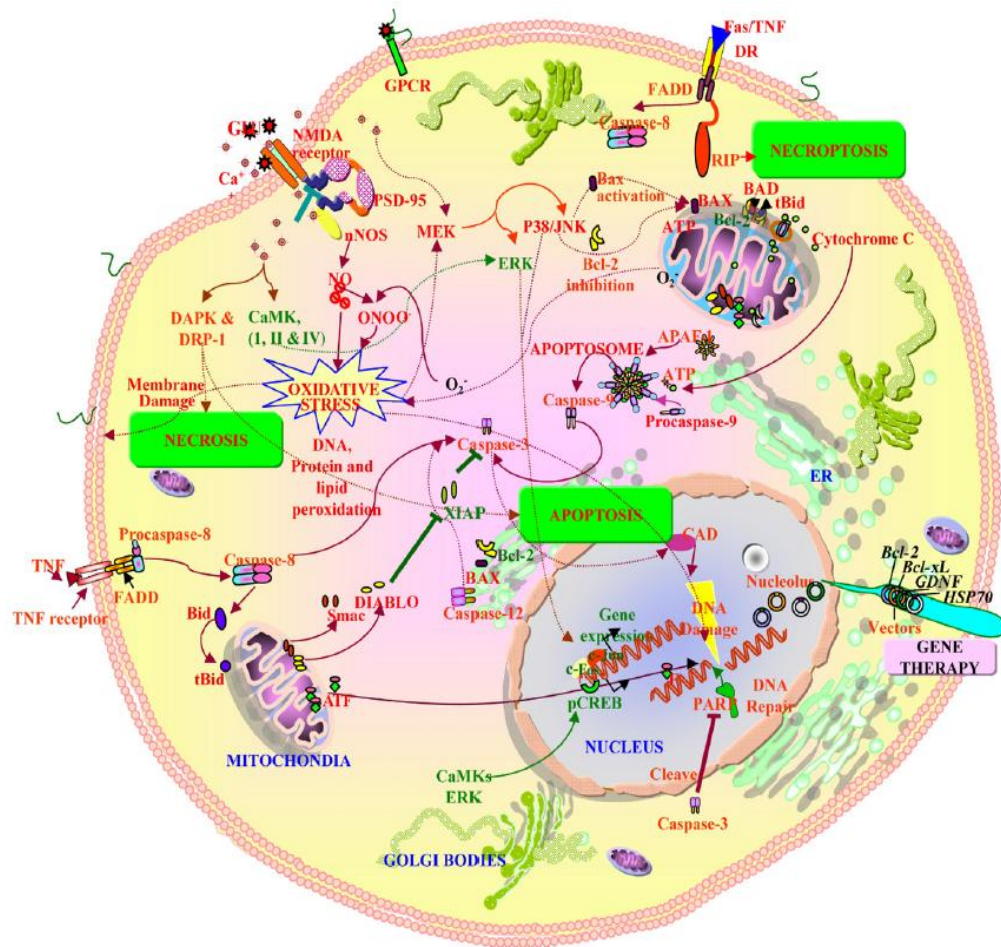


Figura 11. Vie di segnalazione cellulare durante ischemia cerebrale. Il glutammato provoca una stimolazione eccitotossica del recettore NMDA e induce un conseguente influsso di ioni Ca^{2+} e la conseguente attivazione di numerosi enzimi intracellulari sensibili all'aumento di Ca^{2+} intracellulare come NOS e la Ca-Cam chinasi, che portano a danno neuronale. Lo stress ossidativo causato dalle specie reattive dell'ossigeno provoca danni a membrana cellulare, citoscheletro, proteine e DNA. Il danno cellulare può evolvere in morte necrotica, apoptotica o necroptotica, a seconda della severità dello stress; l'apoptosi coinvolge protein chinasi come le caspasi che una volta attivate, specialmente la caspasi 3, degradano proteine costitutive e portano alla morte cellulare.

6. MODELLI ANIMALI DI ISCHEMIA CEREBRALE

Modelli animali *in vivo* di ischemia cerebrale sono utili sia per la comprensione dei meccanismi fisio-patologici dell'insulto ischemico, sia per la valutazione dell'efficacia dei farmaci antischemici. Nel corso del dottorato le ricerche effettuate si sono basate su due modelli di ischemia cerebrale:

- **modello di ischemia focale:** permette di dare origine ad un danno cerebrale focale, a cui sono correlate disfunzioni motorie e caratterizzato da un “core ischemico” che è circondato da zone metabolicamente attive ma silenti da un punto di vista energetico (Astrup et al., 1981) la “penumbra”. Nel ratto si possono utilizzare diversi approcci di tipo sperimentale, il principale dei quali si basa sull’occlusione dell’arteria cerebrale media (MCAo), dal momento che sembra che sia l’occlusione di tale arteria, nell’uomo, ad essere responsabile del 90% degli ictus cerebrali (Berkow e Fletcher, 1981; Karpiak et al., 1989; Mohr et al., 1986). Il metodo subdurale di Tamura e collaboratori (Tamura et al., 1981) è il metodo classico di MCAo, che si conclude con un infarto, a quattro ore dall’occlusione, localizzato sia in corteccia che in striato. Variazioni di tale procedura consistono in un’occlusione più lontana dall’origine della MCA, che permette di ottenere un infarto più corticale (Shigeno et al., 1985), in un’occlusione della MCA associata a quella della carotide comune (Brint et al., 1988), nell’utilizzo di filamenti o microclips per ostruire l’arteria cerebrale media in modo reversibile (Shigeno et al., 1985; Dietrich et al., 1989; Kaplan et al., 1991), oppure nell’occlusione intraluminale della MCA senza craniectomia (Longa et al., 1989), che consente di ridurre il trauma operatorio e di avere un definito infarto striatale. Quest’ultima tecnica prevede l’uso di un filamento di nylon con un diametro equivalente a quello interno dell’arteria carotide interna nel punto di origine della MCA: tale filamento viene introdotto nella carotide esterna e fatto avanzare in quella interna fino all’origine della MCA. A questo livello il filamento blocca tutte le sorgenti di sangue: dalla carotide interna, dall’arteria cerebrale anteriore e da quella posteriore.
- **modello di ischemia globale:** interessa aree molte diffuse, mima il danno che si può riscontrare a livello cerebrale a seguito di un arresto cardiaco e viene solitamente eseguito nel ratto o nel gerbillo. In quest’ultimo, una specie caratterizzata dall’assenza di anastomosi tra le arterie carotidiche e vertebro-basilari, il metodo consiste nell’occlusione bilaterale delle carotidi, con conseguente formazione, dopo molti giorni dall’intervento (Kirino, 1982), di

un danno cerebrale a livello ippocampale molto simile a quello rilevato nell'uomo dopo un infarto al miocardio (Zola-Morgan et al., 1986; Petito et al., 1987). I modelli di ischemia globale nel ratto comprendono invece il modello di occlusione di 2 vasi (two vessel) e quello di 4 vasi (four vessel), che è stato introdotto negli anni '80 da Pulsinelli e Brierley (Pulsinelli e Brierley, 1979) per fornire un modello di ischemia reversibile nelle aree anteriori del cervello. La procedura chirurgica si svolge in due giorni: il primo prevede l'occlusione delle arterie vertebrali, il secondo quella delle arterie carotidi comuni. Successivamente è stato proposto il modello di occlusione di 2 vasi (Smith et al., 1984), che dà origine ad un danno neuronale ischemico a livello dell'ippocampo (nella regione CA1), dello striato e della neocorteccia. La procedura chirurgica si svolge in un solo giorno, con l'occlusione bilaterale delle arterie carotidi comuni e l'induzione di un'ipotensione sistemica. Nel modello 2VO l'occlusione vasale è permanente, non avviene danno da riperfusione e, essendo l'ipoperfusione cerebrale globale, non si osserva la presenza di un core ischemico e della regione di penumbra. Il danno al tessuto nervoso è meno drammatico di quanto osservato nei modelli di ischemia acuta e non ci sono evidenti segni di disfunzioni motorie.

Il flusso sanguigno cerebrale (CBF) diminuisce bruscamente immediatamente dopo 2VO e poi, nel corso dei mesi successivi, si normalizza attraverso meccanismi adattativi di compensazione. La riduzione iniziale maggiore si registra nella corteccia e nella sostanza bianca sottocorticale, a livello ippocampale questa avviene in modo meno marcato (Ohta et al., 1997; Otori et al., 2003; Tsuchiya et al., 1992; Ulrich et al., 1998); dopo una settimana i valori iniziano a ristabilizzarsi gradualmente ma, ancora dopo 4 settimane, sono comunque significativamente più bassi di quelli di controllo (Schmidt-Kastner et al., 2001; Tomimoto et al., 2003). Tra le otto settimane e i tre mesi dall'occlusione si può osservare o una piccola riduzione dei valori o una totale assenza di riduzione, mentre un ritorno ai valori normali si ha solamente dopo sei mesi (Choy et al., 2006).

I cambiamenti del CBF possono essere suddivisi in tre fasi (Fig. 12): una fase acuta (che segue immediatamente l'occlusione e che dura al massimo 2-3 giorni), durante la

quale il CBF diminuisce drasticamente e rimane molto basso, creando le condizioni ipossiche che possono compromettere l'attività elettrofisiologica del tessuto nervoso (Marosi et al., 2006); una fase cronica di ipoperfusione (che dura dalle 8 settimane ai 3 mesi), che rende conto dell'ipoglicemia, dell'oligemia (riduzione della massa sanguigna circolante) e che è quella in cui sembra avvenire il maggior grado di neurodegenerazione; una fase finale di ripristino dei valori basali, durante la quale l'ipoperfusione e le modificazioni metaboliche scompaiono (Farkas et al., 2007). I meccanismi compensatori che permettono al CBF di tornare ai valori normali, nonostante l'occlusione sia permanente, consistono nella dilatazione arteriosa, nel reclutamento di capillari non precedentemente perfusi e nell'angiogenesi (Oldendorf, 1989).

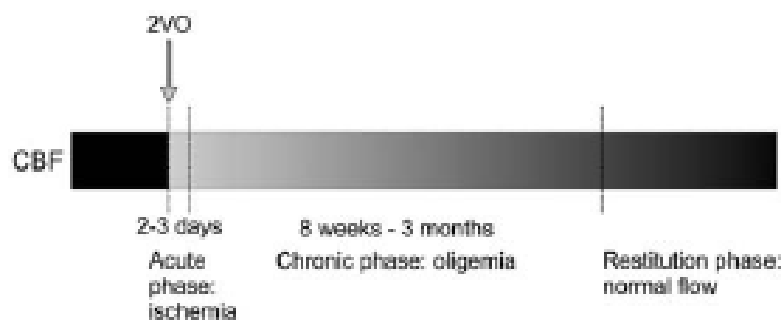


Figura 12. Le tre fasi successive in cui si divide l'ipoperfusione cerebrale cronica.

Durante la fase iniziale dell'ipoperfusione indotta dal modello 2VO, ATP è rapidamente degradato, ma i suoi livelli tornano a quelli di controllo entro otto settimane dall'occlusione. Da ciò si può evincere che la morte per necrosi predomini durante la fase acuta, mentre quella per apoptosi si manifesti più tardivamente (Bennett et al., 1998). E' probabile che sia la rapida ipoperfusione iniziale che la successiva componente oligemica contribuiscano alla perdita neuronale a livello ippocampale, provocando una transizione da necrosi ad apoptosi.

7. FARMACI UTILIZZATI NELLA RICERCA

7.1 il dipiridamolo

Il dipiridamolo (Fig. 13) è un medicinale che è stato sintetizzato circa mezzo secolo fa ma di cui, come è già accaduto per molti altri farmaci, soltanto di recente sono stati compresi i numerosi meccanismi d'azione.

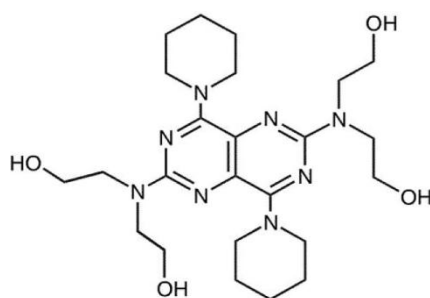


Figura 13. Struttura molecolare del dipiridamolo

Intorno al 1960, il dipiridamolo è stato introdotto in terapia clinica, inizialmente come agente in grado di determinare vasodilatazione coronarica, effetto che è stato visto essere dovuto alla sua capacità di aumentare le concentrazioni extracellulari dell'adenosina inibendo il trasportatore che è deputato al suo reuptake (Henrichs et al., 1983; Bunag et al., 1964).

Il dipiridamolo inibisce dunque il trasportatore dell'adenosina, permettendo di ottenere un notevole aumento dei livelli extracellulari del nucleoside che quindi, tramite l'interazione con i propri recettori, in particolare gli A_{2A} , induce una potente coronarodilatazione. Adenosina inoltre agendo sugli A_{2A} recettori determina l'attivazione dell'adenilato ciclasi e un conseguente aumento dei livelli di cAMP, potente inibitore dell'attivazione piastrinica (Born et al., 1963; Ohisalo, 1987).

L'inibizione portata avanti dal dipiridamolo è dipendente dalla concentrazione: quando il farmaco è 1 μM questa raggiunge il 90% (Klabunde, 1993). Dati recenti di letteratura indicano che inoltre il dipiridamolo mostra un ventaglio di azioni estremamente vasto.

Il dipiridamolo è stato visto essere in grado di inibire la cGMP fosfodiesterasi in diversi tessuti (Gillespie et al., 1989), enzima che porta alla distruzione del cGMP (guanosina monofosfato ciclico), altro forte inibitore dell'aggregazione piastrinica.

Il dipiridamolo ha la capacità di stimolare la produzione della prostaciclina I_2 , o PGI_2 , un potente inibitore endogeno dell'aggregazione piastrinica in quanto, interagendo con specifici recettori presenti sulla membrana delle piastrine, induce un aumento dei livelli intracellulari di cAMP (Neri et al., 1981; Blass et al., 1980; Metha et al., 1982).

E' stato dimostrato che il dipiridamolo presenta anche proprietà antiossidanti (Iuliano et al., 1995), proprietà che oltre a ridurre il potenziale danno portato avanti dai radicali liberi dell'ossigeno (ROS), sembra contribuire anche all'effetto antitrombotico del farmaco (Parthasarathy et al., 1992; Morisaki et al., 1982; Esterbauer et al., 1992). Il dipiridamolo è in grado di eliminare i radicali dell'ossigeno (Iuliano et al., 1989), svolgendo un'azione neuroprotettiva (Blake, 2004), e di inibire la perossidazione lipidica e l'ossidazione delle LDL (Sally et al., 1994).

Alle concentrazioni terapeutiche il dipiridamolo non solo è in grado di ridurre la produzione intracellulare, da parte delle cellule endoteliali, dei ROS e di attenuare così lo stress ossidativo, ma sembra anche determinare una soppressione dell'espressione, da parte delle piastrine, di CD40L (CD40 ligando), proteina transmembrana presente sulla superficie delle sole piastrine attivate, impedendone così l'attivazione (Chakrabarti et al., 2005).

In vivo, la capacità del dipiridamolo di inibire il danno da riperfusione (i danni finali prodotti da un infarto possono infatti essere dovuti, oltre che all'ischemia stessa, anche alla riperfusione, che nonostante rappresenti il mezzo necessario per limitare la progressiva estensione dell'infarto e permettere la rivascolarizzazione, può rappresentare, soprattutto nelle fasi iniziali, la causa di un aggravamento delle lesioni) è stata descritta sia in modelli animali (Kitakaze et al., 1998) e in organi trapiantati (Taniguchi et al., 2004), che in pazienti volontari (Riksen et al., 2005).

E' stato dimostrato che il dipiridamolo ha anche proprietà antinfiammatorie. A concentrazioni terapeutiche il dipiridamolo è in grado di bloccare, inibendo la trascrizione del suo mRNA, la sintesi della chemochina MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) che regola l'accumulo di leucociti nella sede del danno.

Tale inibizione trascrizionale si pensa possa essere attribuita in parte ad una ridotta traslocazione nucleare del fattore di trascrizione NFkB (Weyrich et al., 2005; Xiao e Gohosh, 2005), e in parte all'aumento dei livelli di cGMP (Giustizieri et al., 2002; Wung et al., 2001). Un'altra proteina la cui sintesi sembra essere regolata dal dipiridamolo è la MMP-9 (metalloproteinasi 9), una metalloproteinasi prodotta dai leucociti (monociti) che è considerata un forte predittore di stroke ischemico (Castellanos et al., 2003; Loftus et al., 2001; Zhang et al., 2001) e che, come tutte le metalloproteinasi, è deputata alla degradazione delle proteine presenti sia sulla membrana plasmatica cellulare che all'interno della matrice extracellulare: in presenza di dipiridamolo si ha trascrizione dell'mRNA della proteina, ma non la sua traduzione (Weyrich et al., 2005). Il blocco della produzione della proteina MMP-9 può portare ad una stabilizzazione della barriera ematoencefalica e ad un controllo sia dell'integrità della parete vascolare che del rischio di una sua spontanea rottura.

Ex vivo, il dipiridamolo è in grado di aumentare il rilascio, da parte delle cellule endoteliali microvascolari del cervello, dell'attivatore tissutale del plasminogeno (tPA) in maniera dose dipendente (Kim et al., 2005) e quindi di indurre un aumento della fibrinolisi, processo fisiologico che ha come evento terminale la dissoluzione del reticolo di fibrina formatosi in conseguenza della coagulazione del sangue

Dati clinici hanno dimostrato che, in pazienti affetti da angina stabile cronica, un trattamento orale con dipiridamolo della durata di sei mesi (200 mg della preparazione a rilascio prolungato) ha portato ad un aumento significativo della perfusione tissutale della zona poststenotica (Picano et al., 2000), conferendo quindi al farmaco proprietà antiischemiche dovute alla maggiore utilizzazione dei vasi collaterali che segue l'aumento dei livelli plasmatici di adenosina (Picano et al., 1997; Picano, 1989; Picano et al., 2000).

E' stato inoltre osservato che il dipiridamolo è in grado di mimare l'effetto del preconditionamento ischemico (Mosca et al., 1994), meccanismo di protezione per cui insulti ischemici di breve durata sono in grado di proteggere da una successiva e prolungata ischemia, e di aumentarne la riduzione dell'area di infarto quando somministrato prima della procedura di preconditionamento (Suzuki et al., 1998).

Altri studi hanno infine dimostrato che un trattamento intracoronarico con dipiridamolo riduce l'incidenza di eventi cardiovascolari avversi nelle prime 48 ore che seguono un intervento di angioplastica delle arterie coronarie (Heitland et al., 2000). Il miglioramento della perfusione tissutale indotto dal dipiridamolo potrebbe permettere di spiegare quelle osservazioni cliniche secondo le quali tale farmaco è in grado di ritardare in modo significativo l'evoluzione della glomerulonefrite (Camara et al., 1991) e della proteinuria (Ueda et al., 1986; Zäuner et al., 1994), ossia della presenza anomala delle proteine nelle urine.

7.2 I polioxometallati (POM-4)

Allo scopo di definire in che quota adenosina derivi di “*per sé*” dalla cellula o sia un prodotto di degradazione di ATP extracellulare, è necessario bloccare il metabolismo extracellulare delle purine, inibendo gli enzimi responsabili. Le ecto-nucleotidasi (NTPDasi) hanno differenti specificità di substrato, distribuzione e funzioni nella segnalazione purinergica (Zimmermann, 2000).

Gli inibitori attualmente conosciuti appartengono a tre classi differenti: nucleotidi ed analoghi come il 6-N,N-dietil-D- β,γ -dibromometilene ATP (ARL67156), coloranti sulfonati come Reactive Blue 2 (RB2) e l'acido 8-3-benzamido-4-metilbenzamido-naftalene-1,3,5-trisulfonico (suramina) e i suoi derivati (Zimmermann, 2000; Gendron et al., 2000; 2002). Finora il farmaco più efficace è stato ARL67156, inibitore selettivo che non blocca i recettori P2, ma relativamente debole in quanto non agisce su NTPDasi2 (Iqbal et al., 2005), e mostra diverse costanti di inibizione (K_i) a seconda del sottotipo enzimatico: $K_i=27\ \mu\text{M}$ per NTPDasi1 e $K_i=112\ \mu\text{M}$ per NTPDasi3 (Müller et al., 2006). RB2 e suramina sono anche potenti antagonisti di alcuni sottotipi recettoriali di P2 e quindi possono bloccare gli effetti dei nucleotidi piuttosto che aumentarli (Müller, 2002; Brunschweiler e Müller, 2006; Kennedy, 1990).

Recentemente sono state descritte le azioni di una nuova classe di inibitori di NTPDasi, i polioxometallati (POM), complessi anionici relativamente stabili contenenti ioni di metalli di transizione, come tungsteno, molibdeno o vanadio, posti a ponte tra atomi di ossigeno. Grazie alle cariche negative che presentano a pH

fisiologico e che li rende simili ai nucleotidi, i POM sono dei buoni inibitori delle NTPDasi, senza tuttavia interferire con i recettori P2Y (Müller et al., 2006). Alcuni di questi composti risultano essere altamente stabili in soluzioni acquose a valori di pH fisiologico (Müller et al., 2006) e mostrano attività biologiche sia *in vitro* che *in vivo* documentando effetti antitumorali, antibiotici, antivirali e antidiabetici (Hasenknopf, 2005; Rhule et al., 1998). I POM aventi atomi di tungsteno sono i polioxotungstati, inibitori più potenti di ARL67156, di RB2 e suramina: il polioxotungstato 1 ($\text{Na}_6[\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}]$; POM-1) è reperibile nel mercato ed economico, mentre il polioxotungstato 4 ($\text{K}_6\text{H}_2[\text{TiW}_{11}\text{CoO}_{40}] \cdot 13\text{H}_2\text{O}$; POM-4), sintetizzato di recente, non è ancora disponibile in commercio (Fig. 14). Entrambi producono una marcata inibizione delle NTPDasi1, 2 e 3 ma si differenziano per le caratteristiche peculiari. POM-1 a pH=7.4 presenta 6 cariche negative e resta stabile per più di 14 giorni, con $K_i=2.58 \pm 0.30 \mu\text{M}$ per NTPDasi1, $K_i=28.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$ per NTPDasi2 e $K_i=3.26 \pm 0.18 \mu\text{M}$ per NTPDasi3; POM-4 a pH fisiologico mostra ben 8 cariche negative e rimane stabile per circa 24 ore, con $K_i=0.140 \pm 0.021 \mu\text{M}$ per NTPDasi1, $K_i=0.910 \pm 0.041 \mu\text{M}$ per NTPDasi2 e $K_i=0.563 \pm 0.113 \mu\text{M}$ per NTPDasi3 (Müller et al., 2006).

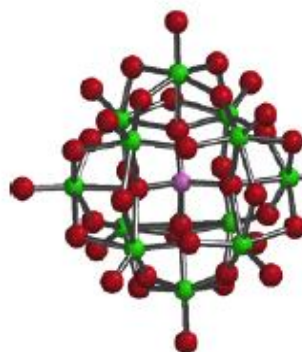


Figura 14. Struttura molecolare della forma anionica di POM-4 $[\text{TiW}_{11}\text{CoO}_{40}]^{8-}$

Studi fisiologici hanno evidenziato che POM-1 era capace di aumentare la dimensione dell'infarto cardiaco che si sviluppa in seguito all'ischemia e di annullare gli effetti protettivi della condizione pre-ischemica cardiaca e/o renale (Köhler et al., 2007; Grenz et al., 2007). Questi eventi sembrano essere il risultato della ridotta degradazione di ATP a dare adenosina, avente azione citoprotettiva per azioni mediate

dai recettori A_1 . Come ARL67156 (Wall e Dale, 2007), POM-1 rallenta il catabolismo di ATP ed agisce molto probabilmente nella prima tappa della degradazione, ovvero nella conversione di ATP in ADP osservando infatti come conseguenza una marcata riduzione della produzione dei metaboliti a tutti ovvero di ADP, AMP e adenosina. Le azioni di POM-1 sono facilmente reversibili, ma non è chiaro se esso agisca in maniera non competitiva o abbia semplicemente una maggior affinità per le NTPDasi rispetto ad ATP. POM-4 è il più potente inibitore di NTPDasi non solo tra i polioxometallati, ma in assoluto, essendo 140 volte più efficiente su NTPDasi1 e 26 volte più efficace su NTPDasi2 rispetto ai composti standard. Ulteriori studi hanno messo alla luce la sua attività antitumorale, che può essere spiegata dall'aumentata attivazione dei recettori P2 dovuta ad un incremento delle concentrazioni extracellulari di nucleotidi.

7.3 Antagonista selettivo per i recettori A_{2A} per adenosina, SCH58261

Negli ultimi anni evidenze sperimentali indicano che il sottotipo recettoriale A_{2A} per adenosina ha un'importanza critica nello stroke (Chen et al., 2007). E' stata dimostrata una over-espressione dei recettori A_{2A} per adenosina sui neuroni e sulla microglia dello striato e della corteccia in seguito ad ischemia focale indotta da occlusione permanente dell'arteria cerebrale media (Trincavelli et al., 2008). Numerosi lavori concordano sul fatto che, in seguito a pMCAo, la somministrazione di antagonisti selettivi dei recettori A_{2A} subito dopo ischemia riduce il danno cerebrale ischemico, il deficit neurologico (Monopoli et al., 1998; Melani et al., 2003; 2006) e la disorganizzazione della mielina (Melani et al., 2009) valutati 24 ore dopo ischemia. Un ruolo deleterio dei recettori A_{2A} in ischemia è riportato da Chen e collaboratori (1999) che dimostrano come la delezione genetica dei recettori A_{2A} riduca il danno ischemico e funzionale in un modello murino di ischemia indotta da MCAo. L'antagonista selettivo dei recettori A_{2A} adenosinergici, 7-(2-feniletil)-5-amino-2-(2-furil)-pirazole-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c] pirimidine (SCH58261) (Fig. 15), protegge significativamente, in un modello di MCAo, a basse dosi (0.01 mg/kg i.p.). Alla stessa dose data i.p., SCH58261 protegge dalla eccitotossicità indotta da acido quinolinico (QA) e dall'efflusso di glutammato (Popoli et al., 2002; Melani et al., 2003).

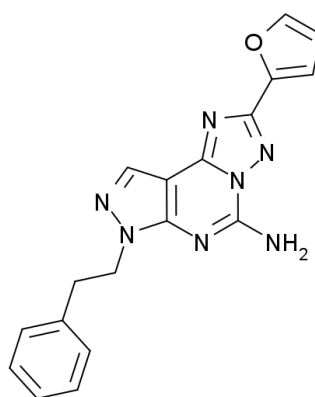


Figura 15. Struttura molecolare di SCH58261

L'effetto neuroprotettivo esercitato da SCH58261 può essere attribuito sia ad un meccanismo diretto su recettori A_{2A} , sia ad un meccanismo indiretto secondario ad una riduzione della liberazione di glutammato. Infatti dopo ischemia si assiste ad un rapido e massivo incremento dei livelli extracellulari di aminoacidi eccitatori (Melani et al., 1999), e la somministrazione acuta di SCH58261 subito dopo l'ischemia riduce tale liberazione (Melani et al., 2003).

Studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato che l'antagonista selettivo dei recettori A_{2A} di adenosina, SCH58261, è protettivo in un modello di pMCAo. La somministrazione ripetuta di SCH58261, 5 minuti, 6 e 20 ore dopo pMCAo, significativamente protegge sia lo striato che la corteccia dal danno ischemico cerebrale, l'associato deficit neurologico e riduce l'espressione di JNK MAPK negli oligodendrociti (Melani et al., 2009) e l'espressione di p38 MAPK nelle cellule microgliali attivate (Melani et al., 2006) 24 ore dopo MCAo.

Scopo della ricerca

1. ESPERIMENTI SUL MODELLO DI OCCLUSIONE DELLE ARTERIE CAROTIDI COMUNI (2VO) CON SOMMINISTRAZIONE DI DIPIRIDAMOLO

Numerosi studi clinici condotti negli ultimi anni hanno dimostrato che il dipiridamolo è un composto dotato di proprietà antiossidanti, antinfiammatorie, vasodilatatrici e antitrombotiche.

Lo scopo di una parte del mio dottorato è stato quello di verificare se la somministrazione di tale farmaco sia in grado di ridurre il danno cerebrale e migliorare le funzioni intellettive in un modello di ischemia cerebrale cronica nel ratto ottenuto mediante l'occlusione bilaterale delle arterie carotidi comuni (2VO). Questo modello animale permette infatti di riprodurre, anche se con alcune limitazioni, le situazioni di ipoperfusione cronica che caratterizzano, nell'uomo, patologie neurodegenerative come la demenza senile e l'invecchiamento.

2. ESPERIMENTI SUL RILASCIO DI ATP ED ADENOSINA, IN CONDIZIONI NORMOSSICHE ED ISCHEMICHE, DALLO STRIATO DI RATTO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di verificare l'origine di adenosina a livello extracellulare nel SNC, valutando il contributo di ATP extracellulare alla formazione di adenosina in condizioni fisiologiche (i.e. normossiche) ed in condizioni ischemiche, in un modello *in vivo*.

Al fine di verificare l'eventuale provenienza dell'adenosina, presente nello spazio sinaptico, dall'idrolisi di ATP extracellulare, è stato utilizzato l'inibitore delle ecto-ATPasi (POM-4 100 μ M), enzimi responsabili dell'idrolisi di ATP presente nello spazio extracellulare ad adenosina.

Per ottenere verifica delle modalità di liberazione di adenosina extracellulare, abbiamo utilizzato il dipiridamolo, inibitore dei trasportatori equilibrativi dell'adenosina.

Dal momento che gli esperimenti hanno suggerito che il rilascio di adenosina sia essere di tipo eccitatorio-secretorio, sono state effettuate verifiche indirette, mediante la tecnica di immunoelettrofluorescenza, isolamento delle vescicole sinaptiche e western blotting, per dimostrare la presenza dei trasportatori concentrativi dei nucleotidi (CNT2), proprio sulle membrane delle vescicole sinaptiche.

3. ESPERIMENTI SUL MODELLO DI OCCLUSIONE TRANSIENTE DELL'ARTERIA CEREBRALE MEDIA (tMCAo) CON SOMMINISTRAZIONE DI SCH58261

Dimostrato l'effetto protettivo dell'antagonista selettivo dei recettori A_{2A} di adenosina, SCH58261, 24 ore dopo ischemia permanente (Melani et al., 1999; 2006; 2009), lo scopo di questo studio è quello di valutare se SCH58261 risulta avere effetti protettivi anche a tempi più lunghi dopo ischemia, come dopo 7 giorni. Per questa valutazione è stato utilizzato un modello di ischemia transiente, ottenuto mediante transiente occlusione dell'arteria cerebrale media (tMCAo), seguita da somministrazione cronica del farmaco. L'eventuale protezione di SCH58261 viene valutata attraverso test comportamentali e valutazione istologica del danno ischemico.

Materiali e Metodi

1. ANIMALI DA ESPERIMENTO

Gli animali utilizzati per gli esperimenti, di tre mesi di età, con un peso corporeo compreso tra 270 g e 290 g e appartenenti al ceppo Wistar (Harlan, Italia), sono stati tenuti, a gruppi di tre, in gabbie di plastica trasparente, con libero accesso ad acqua e cibo, con un ciclo luce-oscurità di 12 ore e in condizioni standard di temperatura e umidità.

Tutti gli esperimenti, al fine di ridurre al minimo il numero degli animali utilizzati e di non procurargli sofferenza, sono stati svolti in osservanza delle direttive del Consiglio della Comunità Europea (86/609/EEC) e delle norme dell'articolo 4 del D.L. 116/92 in materia di sperimentazione animale.

2. OCCLUSIONE BILATERALE DELLE ARTERIE CAROTIDI COMUNI

L'occlusione bilaterale delle arterie carotidi comuni (CCA) è una tipologia di intervento chirurgico che permette di indurre nel ratto uno stato di ipoperfusione cerebrale cronica.

2.1 Tecnica operatoria

La procedura è eseguita in accordo con il modello pubblicato da Sarti e collaboratori (Sarti et al. 2002). Dopo un giorno di digiuno, all'animale viene indotta anestesia mediante inalazione, tramite una maschera facciale, di isofluorano (Baxter) in aria al 5%, concentrazione che viene abbassata e mantenuta a valori intorno a 1-2% per tutto il periodo operatorio.

La temperatura corporea è rilevata e tenuta costante a 37°C grazie ad un tappetino termostato (Harvard, Kent, U.K.) collegato ad un termometro rettale.

L'animale anestetizzato viene posto in posizione supina e su di esso viene effettuata un'incisione longitudinale mediana della cute a livello della faccia ventrale del collo.

Evitando la tiroide, viene quindi disseccato, in modo tale da mettere bene in evidenza il muscolo sternoioideo che avvolge la trachea, il tessuto sottocutaneo e quello connettivale. Il muscolo sternoioideo interseca due muscoli obliqui: a livello craniale quello digastrico, mentre a livello caudale quello sternomastoideo, che si continua con il clevotrapezoidale. Per l'intervento, da questo momento in poi, ci si avvale dell'ausilio di un microscopio bifocale (Zeiss, KL 2500 LCD).

Appena al di sotto dell'intersezione tra muscolo sternomastoideo e muscolo sternoioideo si trova l'arteria carotide comune destra, la quale viene legata (occlusa) a doppio nodo con un filo da sutura non assorbibile in seta nera (Ethicon, Johnson and Johnson).

Al termine dell'operazione l'incisione viene suturata con dei punti metallici e il ratto, una volta riposto nella sua gabbia, lasciato dormire fino all'esaurimento dell'effetto anestetico (10-15 minuti).

Dopo una settimana dall'intervento, la stessa procedura chirurgica viene utilizzata per legare l'arteria carotide comune sinistra.

Subito prima della seconda occlusione, ai ratti trattati con il dipiridamolo (Persantin, Boehringer Ingelheim, 5 mg/ml) e con il solo veicolo (soluzione in cui è normalmente disciolto il dipiridamolo) viene impiantata, a livello sottocutaneo, nella regione dorsale, una mini pompa osmotica (2ML1, Alzet, USA; 1,4 cm di diametro e 5 cm di lunghezza) che, collegata ad un catetere di silicone (0,51 mm ID x 0,07 di spessore, Alzet, USA) che viene inserito nella vena giugulare (Fig. 16), rilascia nel sangue dell'animale, per osmosi, una dose costante di 10 µl/h, per una settimana, di farmaco o di veicolo (considerato il peso medio dei ratti, ciascun animale trattato riceve circa 4 mg/Kg/giorno di dipiridamolo). La pompa viene precaricata con una soluzione salina sterile e lasciata ad incubare a 37°C 12 ore prima dell'impianto per essere stabilizzata.

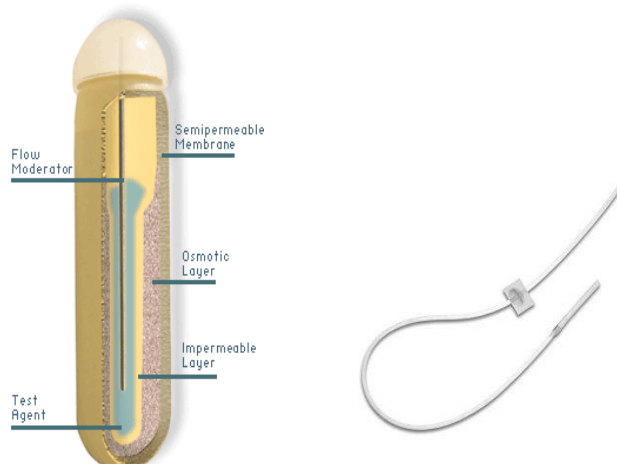


Figura 16. Pompa osmotica e catetere. La pompa funziona grazie ad una differenza di pressione osmotica che si crea tra il salt sleeve, un comparto che si trova all'interno di essa, e il tessuto in cui questa viene impiantata. L'alta osmolarità del salt sleeve determina un flusso di acqua in ingresso nella pompa che avviene tramite la membrana semipermeabile che ne costituisce il rivestimento: via via che l'acqua entra, comprime il serbatoio flessibile e porta al rilascio, ad una concentrazione costante, della soluzione contenuta in esso. Le pompe sono monouso perché i serbatoi non possono essere riempiti di nuovo

Subito dopo la seconda legatura ed una settimana dopo, al momento della rimozione della pompa, gli animali sono trattati con una dose di antibiotico somministrato per via intramuscolare (1 ml di diaminocillina 1,200,000 U.I. in 8 ml di soluzione fisiologica). I ratti sham-operated sono operati seguendo la stessa procedura ma non subiscono né la legatura delle due arterie carotidi comuni né l'impianto della pompa osmotica.

2.2 Impianto della pompa osmotica

Al ratto anestetizzato, posto in posizione supina sul tavolo operatorio, si riapre la cute in corrispondenza del taglio effettuato nel corso della prima legatura e si isola la vena giugulare, che si trova subito al di sotto del tessuto sottocutaneo. Una volta isolata, per bloccarne il flusso sanguigno all'interno questa viene legata, a livello craniale, con un filo da sutura di seta: è così possibile, una volta praticato grazie ad una microforbice, un piccolo foro nella parete endoteliale del vaso, inserirvi, per qualche cm e in direzione del cuore, il catetere che, per essere mantenuto in posizione, viene legato con un secondo filo da sutura insieme alla vena. A questo punto, dopo aver effettuato la

seconda legatura dell'arteria carotide comune e suturato la ferita con dei punti metallici, si pone il ratto in posizione prona e si procede all'alloggiamento della pompa osmotica, che consiste nel praticare un taglio orizzontale sul dorso dell'animale, nello scalzare il tessuto sottocutaneo con delle forbici per creare una sorta di sacca in cui alloggiare la pompa. Al termine dell'operazione si chiude la ferita utilizzando punti metallici e si aspetta che il ratto si risvegli.

3. MICRODIALISI VERTICALE

La microdialisi è una tecnica largamente impiegata per lo studio della neurotrasmissione a livello del SNC, in quanto permette di raccogliere sostanze endogene, come i neurotrasmettitori, che vengono liberate dalle cellule nello spazio interstiziale, e successivamente di misurarne la concentrazione. Essa presenta il vantaggio di poter essere effettuata *in vivo*, cioè in animali svegli e liberi di muoversi. La microdialisi verticale può essere applicata a qualsiasi regione cerebrale, con un trascurabile trauma tissutale, è una tecnica operatoria rapida e permette di dosare campioni in aree cerebrali piccole e profonde e, se necessario, di raccogliere contemporaneamente e separatamente campioni da più zone cerebrali di uno stesso animale.

La membrana da microdialisi consiste in una struttura porosa che consente la libera diffusione di composti con peso molecolare inferiore al suo "cut/off" (20.000 Da) dallo spazio interstiziale all'interno della membrana e viceversa, secondo gradiente di concentrazione. Essa viene utilizzata per l'analisi di molecole endogene presenti nel liquido extracellulare, e per la somministrazione di farmaci direttamente nell'area cerebrale d'interesse. I materiali utilizzati evitano il contatto diretto tra il liquido di perfusione e il tessuto cerebrale, garantendo così la raccolta di campioni extracellulari relativamente puliti per la successiva analisi chimica.

3.1 Probe verticale

Il probe da microdialisi (CMA/12 Elite, CMA, Solna, Svezia) è formato da una membrana costituita da un poliariletersulfone (PAES) (lunghezza 3 mm, diametro interno 0.5 mm, cut-off: 20.000 Da) e da cannule di acciaio inossidabile (diametro esterno 0.64 mm, lunghezza 14 mm) orientate a formare una “Y”, dove sul gambo della “Y” si trova la membrana da microdialisi, il braccio più corto costituisce l’ingresso (inlet) e quello più lungo l’uscita (outlet) del probe (Fig. 17B).

Prima di poter impiantare il probe, è necessario controllarne il corretto funzionamento e sottoporlo a lavaggio, perciò nell’inlet viene inserito un tubicino di polietilene (Guabert Biomedical, diametro interno 0.58 mm, diametro esterno 1.09 mm) che, grazie ad un raccordo di acciaio, è collegato ad una siringa contenente acqua bidistillata collocata in una pompa da microperfusione (CMA/100 Carneige Medicine, Svezia); la membrana viene immersa in acqua tridistillata e si perfonde il probe con un flusso di 10 μ l/min per 10 minuti circa; anche nell’outlet viene inserito un tubicino di polietilene (Guabert Biomedical, diametro interno 0.58 mm, diametro esterno 1.09 mm) collegato ad una microprovetta (Microtube Eppendorf). In questo modo è possibile raccogliere l’acqua fuoriuscita per poi poterne verificare il volume e valutare il corretto funzionamento del probe.

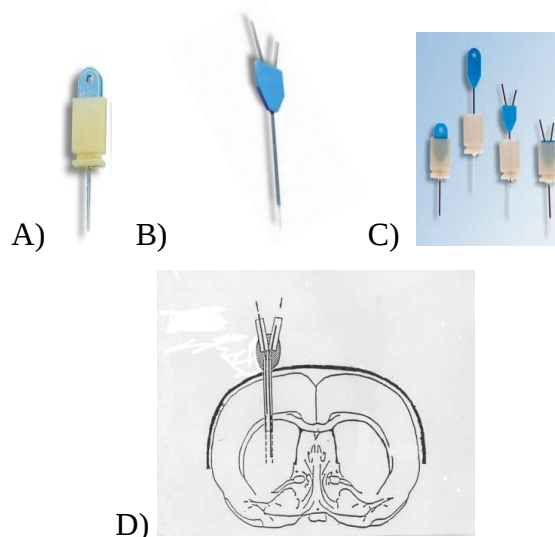


Figura 17: (A) Cannula guida (B) Probe da microdialisi (C) Procedura per l’inserimento del probe: viene rimosso l’inserito dal supporto della cannula guida, all’interno del quale viene inserito il probe da microdialisi. (D) Impianto del probe nello striato di ratto.

I tubicini di polietilene che costituiscono l'inlet e l'outlet vengono poi sigillati a caldo mediante una fiamma per impedire l'ingresso di aria che potrebbe compromettere il corretto funzionamento del probe; inoltre per evitare che la membrana si secchi all'aria, viene mantenuta immersa in acqua bidistillata contenente alcune gocce di etanolo assoluto per impedire la formazione di muffe. L'operazione di microdialisi viene eseguita almeno 24 ore prima dell'impianto del probe; l'intervento consiste nell'inserimento nel cervello, a livello dello striato ventrolaterale destro, di una cannula guida da microdialisi (CMA/12; CMA, Svezia) (Fig. 17A) costituita da un ago di acciaio all'interno del quale esiste lo spazio per inserire il probe da microdialisi (Fig. 17B).

3.2 Tecnica operatoria

Il ratto viene anestetizzato con una soluzione di cloralio idrato (400 mg/kg Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) somministrato per via intraperitoneale e successivamente immobilizzato su un apparecchio stereotassico (Kopf, U.S.A.) sotto cappa a flusso laminare orizzontale. La cute del cranio viene incisa lungo la linea longitudinale mediana, in modo da mettere in evidenza la superficie periostale della calotta cranica. Si rimuove il tessuto cutaneo e sottocutaneo e si procede ad individuare i punti di riferimento: bregma, punto di incontro tra la sutura sagittale e la sutura coronaria, e lambda, punto di incontro tra la sutura sagittale mediana e la sutura lambdoidea. Quando bregma e lambda si trovano sullo stesso piano orizzontale, l'animale è ben posizionato sull'apparecchio stereotassico.

Le coordinate per l'impianto della cannula guida si ricavano dall'atlante stereotassico di Paxinos e Watson (1982), e per la collocazione a livello dello striato ventrolaterale destro le coordinate rispetto al punto di bregma sono: anteroposteriorità (AP)= +0.7 mm, lateralità (L)= -3.2 mm e altezza (H)= -3.5 mm. Una volta individuate le coordinate AP e L, sulla volta cranica viene segnato un punto con una matita e su questo viene praticato un foro con un trapano attraverso il quale viene fatta passare la

cannula guida, precedentemente fissata ad un micromanipolatore, che in questo modo viene inserita nel cervello ad una profondità definita dalla coordinata H (Fig. 17D).

Sulla calotta cranica, ai lati del foro, vengono praticati due altri fori nei quali saranno inserite due viti in modo da stabilizzare la struttura che sorreggerà la cannula guida. Attorno alla cannula guida viene inserito un cilindro di polietilene di lunghezza 1.5 cm e diametro 1 cm, che avrà la funzione di proteggere la cannula guida. Per stabilizzare il tutto, si usa cemento dentale a presa rapida (Kerr) con cui viene riempito lo spazio compreso tra la cannula guida e il cilindro e vengono riuniti i lembi cutanei attorno al cilindro stesso.

L'animale viene poi liberato dall'apparecchio stereotassico e riposto in una gabbia di plexiglas per un completo recupero dall'anestesia.

Due ore dopo si procede all'inserimento della membrana da microdialisi rimuovendo il supporto esterno della cannula guida e collocando il probe nell'apposito spazio da questa descritto dalla figura 17C.

3.3 Raccolta di campioni di dialisato cerebrale

La raccolta di campioni di dialisato è una procedura che viene eseguita dopo 24 ore dall'impianto del probe, in animali svegli e liberi di muoversi. Le estremità dei tubi di polietilene, precedentemente sigillate alla fiamma, vengono tagliate riaprendo così i tubi.

L'inlet viene collegato mediante un raccordo di acciaio e un tubo di polietilene di circa 50 cm, ad una siringa posta nella pompa da microperfusione (CMA/100 Carnegie Medicine, Svezia, velocità di flusso 3µl/min), mentre l'outlet viene collegato, attraverso raccordi di acciaio e un tubo di polietilene, a microprovette (Microtube Eppendorf) per la raccolta del dialisato.

Il probe viene perfuso con la soluzione Ringer (NaCl 147 mM, KCl 4.0 mM, CaCl₂ 2,3 mM, pH= 7.0) o con la soluzione contenente i farmaci da somministrare. Inizialmente si pratica una perfusione a vuoto per circa 90 minuti con una velocità di flusso di 3µl/min necessaria per stabilizzare il sistema. Successivamente inizia la raccolta dei campioni di perfusato della durata di 30 minuti ognuno, quindi un volume finale di 90 µl.

I farmaci utilizzati con la microdialisi sono inibitori delle ecto-nucleotidasi: BGO136 (1-naphthol-3,6-disulfonic acid disodium salt hydrate) e POM-4 (hexapotassium dihydrogen monotitanoundecatungstocobaltate(II) tridecahydrate ($K_6H_2[TiW_{11}CoO_{40}] \cdot 13H_2O$). BGO136 (50 mM) è inibitore selettivo delle NTPDasi 1 e 2. POM-4 (100 μ M) è stato recentemente sintetizzato e gentilmente offerto dalla Prof.ssa Muller (Muller et al., 2006) ed inibisce selettivamente le NTPDasi 1, 2 e 3. In base a dati presenti in letteratura sugli effetti di questi inibitori delle ecto-ATPasi, in esperimenti *in vitro* (Coppi et al., 2007; Duval et al., 2003), le concentrazioni nella soluzione di perfusione sono state aumentate di dieci volte poiché la diffusione del farmaco attraverso il probe da microdialisi è stata calcolata come pari al 10% della concentrazione del farmaco in soluzione.

Il dipiridamolo (100 μ M), inibitore del trasportatore equilibrativo dei nucleotidi, viene anch'esso diluito in soluzione di Ringer. Il dipiridamolo utilizzato, è in fiale da 5 mg/ml (Persantin, Boheringer Ingheleim). La concentrazione 100 μ M è stata scelta sulla base di precedenti lavori (Pazzagli et al., 1993) che hanno dimostrato che il farmaco blocca i trasportatori equilibrativi.

I campioni di perfusato sono mantenuti ad una temperatura di -20°C fino al momento del dosaggio di ATP e adenosina.

4. ESPERIMENTO DI RECUPERO *in vitro*

La microdialisi consente di studiare il liquido presente nello spazio interstiziale cerebrale, determinarne la composizione e dosarne le sostanze presenti.

La concentrazione di una sostanza che diffonde attraverso la membrana da microdialisi, e che quindi si ritrova nel perfusato, rappresenta solo una frazione della concentrazione interstiziale, questo a causa di molteplici fattori: velocità di perfusione, temperatura, superficie della membrana; anche le caratteristiche stesse della membrana possono influire su questa concentrazione, come ad esempio la dimensione dei pori e il materiale di cui è costituita, è noto inoltre che alcune sostanze si legano al materiale che costituisce la membrana e ne alterano il recupero.

Con il termine recupero si definisce la percentuale della concentrazione di una determinata sostanza nel perfusato (C_{int}) rispetto alla concentrazione della stessa, nella soluzione esterna alla membrana (C_{ext}), [RECUPERO= (C_{int}/C_{ext}) x 100].

Allo scopo di determinare la percentuale di recupero delle sostanze in esame, vengono eseguiti esperimenti *in vitro*: a temperatura ambiente il probe viene immerso in una soluzione Ringer, contenente concentrazioni note di ATP e adenosina, e poi viene perfuso con la sola soluzione Ringer ad una velocità di flusso costante di 3 μ l/min; vengono raccolti 3 campioni, uno ogni 30 minuti, aventi un volume di 90 μ l ciascuno, e successivamente vengono analizzati con il sistema luciferina-luciferasi per il dosaggio di ATP, e con HPLC per il dosaggio di adenosina.

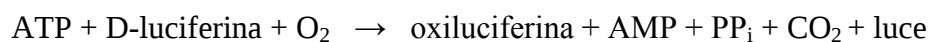
Il recupero ottenuto con le membrane per la microdialisi verticale da noi utilizzate, è pari a $9.84 \pm 0.81\%$ per adenosina e $3.17 \pm 0.97\%$ per ATP.

Tutti i valori delle concentrazioni di adenosina e ATP riportati sono stati corretti per la percentuale di recupero ottenuta.

5. DOSAGGIO DI ATP

Per il dosaggio di ATP vengono utilizzati appositi materiali e precauzioni per evitare contaminazioni, in quanto l'ATP è contenuto anche nelle mani e nei capelli: si utilizzano perciò guanti in lattice o nitrile, materiale ATP-free, H₂O tridistillata sterile e contenitori usa e getta.

Il dosaggio viene fatto misurando la quantità di ATP con ATPLite-M Kit (Perkin-Elmer, Life and Analytical Sciences, Boston, MA) che sfrutta la produzione di luce da parte della seguente reazione catalizzata dall'enzima luciferina in presenza di Mg⁺⁺:



La quantità di luce prodotta è direttamente proporzionale alla quantità di ATP presente nel campione, qualora la sua concentrazione sia compresa tra i 10^{-11} e 10^{-6} M.

Il kit contiene ATP e luciferina-luciferasi (soluzione substrato) liofilizzati e soluzione buffer; deve essere conservato ad una temperatura compresa tra i +2°C e +8°C. L'ATP viene ricostituito con acqua tridistillata in modo da ottenere una soluzione di ATP 10 mM, e in seguito conservato a -20°C, temperatura alla quale rimane stabile per alcune settimane. La soluzione substrato, invece, viene ricostituita con 5 ml di soluzione buffer. Si agita leggermente e si conserva a + 4°C (l'attività si riduce del 30% dopo una settimana) o a -20°C per periodi più lunghi.

Viene costruita una curva standard utilizzando soluzioni di ATP a concentrazione nota (da 10^{-7} a 10^{-11} M). Gli standard preparati vengono conservati in ghiaccio dove rimangono stabili per 8 ore e vengono dosati in piastre bianche multipozzetto da 96 pozzetti (OptiPlate-96 PerkinElmer).

Per ogni standard si esegue una doppia misurazione dell'ATP calcolando poi la media dei due valori ottenuti così da ridurre al minimo l'errore.

In ogni pozzetto utilizzato si iniettano, con una pipetta Gilson su cui vengono montate punte ATP-free monouso, 50 µl di soluzione standard ed un'uguale quantità di soluzione substrato: l'aggiunta del substrato deve essere eseguita preferibilmente al buio o almeno evitando l'esposizione diretta dei raggi solari o di luce al neon in quanto potrebbero indurre un aumento della luminescenza, falsando così i risultati. In seguito la piastra viene sigillata con una pellicola adesiva trasparente, coperta con un foglio di alluminio per proteggerla dalla luce e messa su un agitatore per 10 minuti in agitazione lenta.

Il dosaggio viene eseguito al luminometro (TopCount Packard Instruments, Perkin-Elmer), strumento che rileva la luminescenza derivata dalla reazione catalizzata dalla luciferina: la luminescenza prodotta sarà direttamente proporzionale alla quantità di ATP presente, e con i risultati ottenuti è possibile costruire la curva standard.

Una volta verificato che gli standard siano proporzionali tra loro, si può procedere al calcolo delle concentrazioni dei campioni conservati in eppendorf a -20°C, che vengono scongelati e conservati in ghiaccio. Da ogni eppendorf si prelevano 50 µl di campione con una siringa Hamilton da 100 µl ripetutamente risciacquata con acqua bidistillata tra un prelievo e l'altro, per evitare contaminazioni; in ogni pozzetto si dispongono 50 µl di campione e 50 µl di soluzione substrato, e dopo il mescolamento sull'agitatore si dosa al luminometro.

La quantità minima di ATP misurabile è 10 fm, i valori vengono espressi in concentrazioni nanomolari (Melani et al., 2005) ed ogni valore è corretto per il recupero della fibra da microdialisi.

In situazioni particolari, quali il dosaggio di campioni contenenti una molecola che potrebbe interferire in qualche modo con la reazione (ad esempio POM-4), si deve allestire una curva standard di ATP preparata con una soluzione contenente una uguale concentrazione di POM-4 presente nei campioni (100 μ M).

Alle concentrazioni utilizzate (100 μ M) POM-4 interferisce minimamente con il dosaggio.

6. DOSAGGIO DI ADENOSINA

Per valutare la presenza di adenosina nei campioni, si utilizza la cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) abbinata ad uno fluorimetro (LC-240, Perkin Elmer, Norwalk, CT, U.S.A.) con una lunghezza d'onda di eccitazione fissata a 270 nm e una lunghezza d'onda di emissione posta a 394 nm (Melani et al., 1999). La tecnica cromatografica prevede l'utilizzo di una colonna C-18 (diametro interno: 4.6 mm; lunghezza 150 mm; Waters, MA, U.S.A.), per evitare che il sistema si occluda con materia particolata, è stato incorporato nel sistema HPLC, a monte della fase stazionaria, un filtro Waters In-Line con pori di 2 μ m. La fase stazionaria è data da particelle di 3.5 μ m e la fase mobile è costituita da 50 mM di acetato di sodio (pH=5.0), 5% di acetonitrile (v/v) e 1 mM di acido 1-ottansulfonico sodico (Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y.) che viene pompata all'interno della colonna con una velocità di flusso di 0.8 ml/min.

Ad ogni μ l di campione raccolto viene aggiunto 0.14 μ l di acetato di zinco (0.1 M). Poi la soluzione viene trasferita in una vial di vetro dove per ogni μ l di soluzione vengono aggiunti 0.18 μ l di cloracetaldeide (4.5%) per la derivatizzazione. Tale reazione è permessa tenendo le soluzioni a 100°C per 20 minuti; in seguito alla quale si ottiene un derivato fluorescente di adenosina (1,N⁶-etenoadenosina), che può essere analizzato. Una volta iniettate le soluzioni in colonna, per ciascun campione si ottiene

un cromatogramma in cui la presenza di adenosina è indicata dalla descrizione di picchi e la quantità minima rilevabile è 0.1 pm di adenosina; per verificare che effettivamente si tratti di adenosina e non di altra molecola simile, si provvede all'incubazione con 1 U (unità) di adenosina deaminasi a temperatura ambiente per 1 minuto osservandone la conseguente scomparsa. I picchi di adenosina sono identificati e quantificati paragonando il tempo di ritenzione e l'altezza dei picchi con gli standard noti, analizzati in precedenza con la medesima procedura. Utilizzando soluzioni contenenti concentrazioni note di adenosina si ottiene una curva standard necessaria per calcolare la concentrazione di adenosina nei campioni di dialisato. I valori delle concentrazioni di adenosina sono espressi in valore assoluto, ogni valore viene corretto per il recupero della fibra da microdialisi. Quando espressi in percentuale queste rappresentano la variazione percentuale del valore basale espresso come la media dei primi quattro campioni. POM-4 (100 μ M) ed il dipiridamolo (100 μ M) non interferiscono con il dosaggio di adenosina.

7. OCCLUSIONE DELL'ARTERIA CEREBRALE MEDIA (MCAo)

L'occlusione dell'arteria cerebrale media determina un'ischemia cerebrale focale, a livello dello striato e corteccia fronto-parietale, e nell'uomo è la principale causa di ischemia.

7.1 Tecnica operatoria

L'occlusione viene effettuata nei ratti sotto cappa a flusso laminare orizzontale. Per convenzione viene occlusa l'arteria di destra.

Il ratto è anestetizzato, per mezzo di una maschera facciale, con isofluorano (Rhone-Poulenc) in aria, inizialmente al 5% e poi mantenuto al 1-2% in anestesia profonda. La temperatura è controllata con un termometro transrettale e mantenuta costante a 37°C con un tappetino termostato (Harvard, Kent, U.K.).

In posizione supina viene praticata un'incisione longitudinale mediana della cute a livello della faccia ventrale del collo. Il tessuto sottocutaneo e connettivale è dissecato fino a mettere in evidenza il muscolo sternoioideo che avvolge la trachea. Tale muscolo a livello craniale interseca il muscolo digastrico e a livello caudale quello sternomastoideo. Questi ultimi due sono i punti di "repere".

Il resto dell'operazione è effettuata sotto microscopio bifocale (Zeiss, KL 2500 LCD). A livello caudale, appena sotto l'intersezione del muscolo sternoideo con lo sternomastoideo, si trova l'arteria carotide comune destra che deve essere delicatamente separata dai tessuti connettivali e dal nervo vago. A livello craniale, appena sotto l'intersezione dello sternoideo con il digastrico, si trova la biforcazione carotidea formata dall'arteria carotide esterna destra e l'arteria carotide interna destra, originate dall'arteria carotide comune destra. L'arteria carotide esterna è isolata dal connettivo e dal nervo vago. L'arteria occipitale, collaterale dell'arteria carotide esterna, viene isolata e suturata con un elettrocoagulatore (2Biological Instruments).

Attorno all'arteria carotide esterna è passata una sutura di seta 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson) e legata strettamente attorno all'arteria in posizione quanto più craniale possibile. Agendo sulla sutura è portata in evidenza un'altra zona dell'arteria utilizzata per far passare attorno all'arteria una seconda sutura, anch'essa legata strettamente. Con delle microforbici è tagliato il tessuto compreso tra le due suture ottenendo due monconi dell'arteria carotide esterna: uno craniale e uno caudale. Il primo, per risposta elastica dell'arteria in trazione, scompariva nel tessuto, mentre il secondo, in continuazione con la biforcazione, restava libero. Il moncone, la biforcazione e l'arteria carotide interna sono liberati e ripuliti dal tessuto connettivo e adiposo. Una piccola arteria che si sviluppa dalla biforcazione e che decorre parallela all'arteria carotide interna è suturata mediante elettrocoagulazione. Attorno al moncone è eseguita una sutura lente e applicate due clips per interrompere il flusso sanguigno in quella zona. Una clip era situata a livello dell'arteria carotide comune e l'altra a livello dell'arteria carotide interna, in modo da effettuare un foro nel moncone con le microforbici per far passare un filamento di nylon Ethilon 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson) precedentemente preparato. Il filamento è spinto dentro l'arteria carotide interna. La clip è rimossa e il filamento fatto scorrere nell'arteria carotide interna per circa 18-22 mm fino a bloccare l'origine dell'arteria cerebrale media. Per il modello di

occlusione permanente il filamento inserito non è più tolto, mentre nel modello di ischemia transiente il filamento rimane inserito per 60 minuti e dopo tale periodo viene rimosso in animali nuovamente anestetizzati.

Il taglio cutaneo era suturato, sospesa l'anestesia e il ratto riposto in una gabbia di plexiglas con libero accesso al cibo e all'acqua.

Per gli animali sham-operated è usata la stessa tecnica, ma il filamento di nylon, inserito nell'arteria carotide interna fino all'origine dell'arteria cerebrale media, è subito ritirato.

7.2 Preparazione del filamento da occlusione

Il filamento di nylon Ethilon 4-0 viene preparato il giorno prima dell'occlusione. Un'estremità viene riscaldata alla fiamma in modo da ottenere una punta arrotondata e con un pennarello a vernice bianca viene fatto un segno a 20-22 mm dalla punta stessa. Poi viene tagliato ad una lunghezza di 25-26 mm e rivestito all'estremità arrotondata da un film di silicone (Xantopren VL plus, Heraeus Kulzer) ed un indurente (Flussigharter, omnident) per circa 5 mm.

8. SOMMINISTRAZIONE DEI FARMACI

Nel modello di ipoperfusione cronica, indotta mediante 2VO, il dipiridamolo (Persantin, Boehringer Ingelheim, 5 mg/ml) o il solo veicolo sono rilasciati nel sangue dell'animale, per osmosi grazie alla mini pompa osmotica (2ML1, Alzet, USA; 1,4 cm di diametro e 5 cm di lunghezza) impiantata dopo la legatura della arteria carotide sinistra (che segue di una settimana la legatura della arteria carotide destra), ad una dose costante di 10 µl/h, per una settimana, (considerato il peso medio dei ratti, ciascun animale trattato riceve circa 4 mg/Kg/giorno di dipiridamolo).

Negli esperimenti per valutare le concentrazioni di adenosina ed ATP a livello extracellulare, i campioni sono raccolti 24 ore dopo l'inserimento del probe nello striato di ratto. In condizioni basali, i.e. fisiologiche, gli inibitori selettivi dell'idrolisi

di ATP, POM-4 (100 μ M) e BGO136 (50 mM), sono somministrati dopo il periodo di stabilizzazione del probe e la successiva raccolta di 4 campioni basali. I campioni raccolti durante la somministrazione dei farmaci sono 8. In condizioni ischemiche, l'occlusione dell'arteria cerebrale media viene effettuata 24 ore dopo l'impianto del probe. Dopo il periodo di stabilizzazione del probe, sono raccolti quattro campioni basali, successivamente i ratti sono sottoposti a MCAo e poi sono raccolti 8 campioni in ischemia. Nei ratti ischemici trattati con POM-4 (100 μ M) il farmaco è somministrato dal periodo della stabilizzazione del probe fino alla fine della raccolta dei campioni.

Nel modello di ischemia transiente l'antagonista selettivo dei recettori A_{2A} di adenosina, SCH58261, viene somministrato cronicamente via intraperitoneo alla dose di 0,01 mg/kg, 5 minuti, 6 ore e per 2 volte al giorno nei sette giorni successivi a ischemia focale transiente indotta mediante MCAo di una ora.

9. TEST COMPORTAMENTALI

I ratti, dopo essere stati pesati su una bilancia per valutarne il peso corporeo, vengono sottoposti a vari tipi di test comportamentali che permettono di osservarne le funzioni motorie, sensoriali e cognitive. I test sono eseguiti prima delle operazioni e in momenti successivi diversi a seconda del modello sperimentale in studio.

9.1 Esame Obiettivo Neurologico (EON)

L'esame obiettivo neurologico, EON (Garcia et al., 1995), viene effettuato su tutti i ratti 24 ore prima dell'intervento e in momenti successivi, diversi a seconda del modello sperimentale utilizzato.

L'EON valuta le funzioni motorie e sensoriali ed è costituito da sei test:

- 1) attività motoria spontanea: è osservato il comportamento dell'animale per 5 minuti all'interno di una nuova gabbia.

- 2) simmetria dei movimenti dei quattro arti: il ratto viene tenuto sollevato per la coda e si osserva la simmetria dei movimenti dei quattro arti.
- 3) simmetria degli arti anteriori: sempre tenuto per la coda, si valuta l'abilità dell'animale nel camminare con le sole zampe anteriori.
- 4) arrampicamento: si valuta la capacità del ratto di salire su di un piano inclinato a 45°.
- 5) reazione di posizionamento (propriocezione corporea): l'animale viene delicatamente punto con uno spillo su entrambe le parti corporee (destra e sinistra).
- 6) risposta al tocco delle vibrisse: con la punta di uno spillo vengono sfiorate le vibrisse su entrambe le parti corporee.

Il punteggio totale assegnato a ciascun ratto al termine dell'EON è dato dalla somma dei punteggi conseguiti nei singoli test. Il punteggio minimo è 3, il massimo è 18.

9.2 Modified Neurological Sensitivity Score (mNSS) test

Il test mNSS è costituito da vari test (Chen et al., 2001), ed è basato su una scala da 0 a 18 (punteggio normale: 0, punteggio di massimo deficit: 18). I ratti sottoposti ad occlusione transiente dell'arteria cerebrale media sono sottoposti a questo test prima e 1, 5 e 7 giorni dopo l'operazione.

Test motori

Tenere il ratto dalla coda	3
Flessione delle zampe anteriori	1
Flessione delle zampe posteriori	1
Movimento della testa >10° rispetto all'asse verticale in 30 s	1
Posizionare il ratto su un piano (normale=0; massimo=3)	3

Camminata normale	0
Incapacità di camminare diritto	1
Movimenti circolari dalla parte paretica	2
Cade dalla parte paretica	3
<i>Test sensoriali</i>	
Placing test (test visivo e tattile)	1
Test propriocettivo	1
<i>Test Beam balance (normale=0; massimo=6)</i>	
Si muove correttamente sulla trave	0
Si aggrappa alla trave	1
Abbraccia la trave ed 1 zampa cade dalla trave	2
Abbraccia la trave e 2 zampe cadono dalla trave, o si gira sulla trave (>60 s)	3
Tenta di stare in equilibrio sulla trave ma cade (>40 s)	4
Tenta di stare in equilibrio sulla trave ma cade (>20 s)	5
Cade; non riesce a rimanere sulla trave (<20 s)	6
<i>Assenza di riflessi e movimenti anormali</i>	
Riflesso uditivo (scuote la testa quando il padiglione auricolare è toccato)	1
Riflesso corneale (socchiude gli occhi quando la cornea è sfiorata con cotone)	1
Riflesso di spavento (si muove in seguito ad un breve rumore di schiocco)	1
Attacchi epilettici	1

Per il *beam balance test* i ratti sono allenati, nei tre giorni prima dell'operazione, a camminare sulla trave che è sospesa circa 40 cm da terra.

9.3 Object Recognition Test (ORT)

L'ORT (Fig. 18) è un test che ha come obiettivo quello di valutare la memoria non spaziale del ratto e che si basa sulla tendenza spontanea dei roditori ad osservare per più tempo un oggetto sconosciuto rispetto ad uno familiare (Ennaceur e Delacour, 1998; Bartolini et al., 1996). Le valutazioni sono eseguite la settimana antecedente la prima legatura e 30, 60 e 90 giorni dopo la seconda legatura, nei ratti sottoposti a 2VO. Per svolgere l'esperimento si fa utilizzo di una scatola di legno grigia, di dimensioni 60x60x45 cm, con il pavimento ricoperto di segatura e illuminata artificialmente da una lampada a 75 W, e di un set di oggetti in polivinile cloruro grigio di due forme diverse: 2 cubi di 6 cm di lato e un parallelepipedo di lato 6 cm e di altezza 12 cm.

Il giorno prima del test si procede facendo esplorare a ciascun ratto, per due minuti, l'interno della scatola vuota, ossia in assenza degli oggetti, mentre il giorno stesso della prova la valutazione viene suddivisa in due sessioni, intervallate l'una dall'altra da due ore e mezzo di tempo. Durante il primo turno, all'interno della scatola sono presenti i due cubi identici, e nei cinque minuti di esplorazione che sono permessi a ciascun animale viene cronometrato il tempo di esplorazione totale dei due oggetti e quello che è necessario all'animale per esplorarli entrambi per 20 secondi. Nel corso della seconda fase, invece, durante la quale ogni ratto viene nuovamente osservato per cinque minuti, uno dei due cubi viene sostituito con il parallelepipedo, in modo tale da poter cronometrare il tempo di esplorazione dell'oggetto familiare (F) e di quello nuovo (N).

Si considera esplorazione l'avvicinamento del muso all'oggetto ad una distanza inferiore a 2 cm e il tocco dell'oggetto con il naso; il sedersi sull'attrezzo non è invece da considerarsi un comportamento esplorativo.

I ratti che non esplorano uno solo o entrambi gli oggetti durante il secondo turno del test vengono esclusi dalla valutazione, ossia dal calcolo dell'indice DI ($(N-F)/(N+F)$) che permette di normalizzare i dati escludendo la variabilità individuale e di confrontare i tre diversi gruppi.

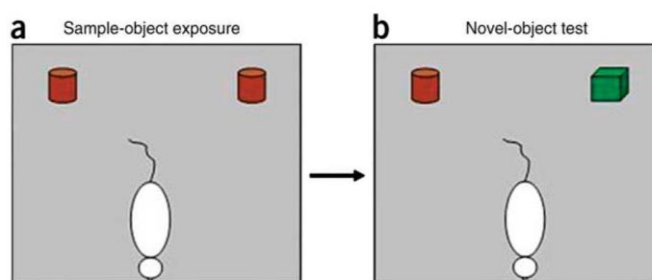


Figura 18. Svolgimento dell'object recognition test

9.4 Y Maze Test

L'Y Maze Test (Fig. 19) consente di valutare la memoria spaziale dell'animale (Mulas et al., 1970; Maurice et al., 1994). Le valutazioni sono eseguite la settimana antecedente la prima legatura e 30, 60 e 90 giorni dopo la seconda legatura, in animali sottoposti a 2VO. Lo svolgimento del test consiste nel porre il ratto all'interno di un percorso simmetrico a forma di Y (lunghezza di ogni ramo 40 cm; larghezza 14 cm), illuminato artificialmente da una lampada a 100 W e con il pavimento ricoperto di segatura, e nell'osservare la sua alternanza spontanea, ossia quel comportamento istintivo che normalmente lo porta ad esplorare alternativamente le tre braccia del percorso piuttosto che ripercorrere immediatamente quello appena esplorato. Si ha perciò alternanza spontanea quando l'animale percorre prima il braccio uno, poi il due, poi il tre e così via, senza ripetizioni (Malm et al., 2006). L'ingresso in un braccio dell'Y Maze è da considerarsi valido solo quando il ratto vi è penetrato con tutte e quattro le zampe. Il tragitto percorso da ciascun animale, che viene lasciato nel labirinto per otto minuti, viene inoltre registrato da una telecamera.

Al termine dell'esperimento viene calcolata la percentuale di alternanza, che è espressa come $(\text{set di triplette} / \text{numero totale delle entrate} - 2) \times 100$.

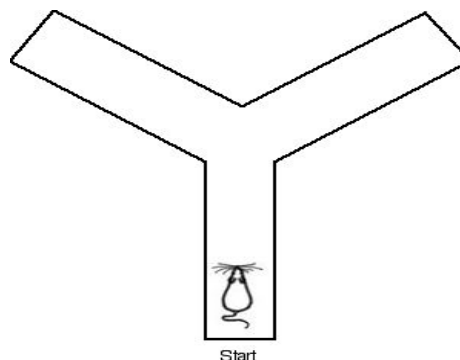


Figura 19. Rappresentazione schematica dell'Y maze

Il giorno prima dello svolgimento dell'ORT e dell'Y Maze Test è necessario trasferire gli animali nella stanza in cui verrà eseguito l'esperimento e manipolarli per almeno un'ora, così da abituare i ratti sia all'odore che alla presenza dello sperimentatore.

9.5 Rotarod test

Il test rotarod (Ugo Basile Biological, Comerio, Italy) è utilizzato per valutare la coordinazione motoria e l'equilibrio nei gruppi di ratti sottoposti ad occlusione transiente dell'arteria cerebrale media. La mattina dell'operazione i ratti sono allenati a stare sul rotarod per 10 minuti prima di essere sottoposti all'intervento. L'accelerazione del rotarod è mantenuta ad una velocità costante di 12 giri al minuto. Ogni animale è testato una volta al giorno per 10 minuti, se l'animale cade 6 volte il test viene fermato. Del test rotarod viene valutato il tempo speso sopra da ogni ratto ed il numero delle cadute.

10. ANALISI ISTOLOGICA

Trascorsi i tempi stabiliti nei vari modelli sperimentali utilizzati, i ratti di ciascun gruppo sono stati sacrificati mediante la tecnica della perfusione transcardiaca e da

questi è stato prelevato il cervello, che, dopo un opportuno trattamento, è utilizzato per eseguire l'analisi istologica.

10.1 Perfusione transcardiaca

Gli animali sono anestetizzati, mediante un'iniezione intraperitoneale, con una soluzione di cloralio idrato (400 mg/Kg) e, una volta in anestesia profonda, vengono posizionati supini sul tavolo operatorio e sottoposti alla perfusione transcardiaca.

Si esegue un'incisione mediana del torace, in modo da esporre lo sterno, e successivamente si incidono, da entrambi i lati, le strutture sottocutanee e le coste, al fine di sollevare la gabbia toracica e mettere ben in evidenza il cuore. A questo punto, per mezzo di una pinza chirurgica, si procede chiudendo l'aorta discendente, che corre lungo la colonna vertebrale in posizione mediana, e inserendo un ago nel ventricolo cardiaco sinistro. L'ago in questione è collegato ad una pompa peristaltica da perfusione attraverso un tubo di polietilene ed è mantenuto fermo in sede tramite una pinza chirurgica. Grazie alla pompa peristaltica, dopo aver avuto cura di incidere, preventivamente, l'atrio cardiaco destro, sono a questo punto fatti passare, attraverso il ventricolo sinistro e quindi l'aorta ascendente, 200-300 ml di una soluzione al 4% di paraformaldeide in tampone fosfato 0,15 M (pH 7,4) ad un flusso di 20 ml/min.

10.2 Estrazione, congelamento e taglio dei cervelli

Terminata la perfusione, il cranio dell'animale è aperto per mezzo di una ossivora, il cervello è rimosso e tenuto per 24 ore in paraformaldeide al 4% (post-fissaggio), successivamente è posto in una soluzione di saccarosio al 18% in tampone fosfato a bassa molarità (PBSB, ossia soluzione fisiologica 10% e tampone fosfato 5%), così da essere crioprotetto fino al momento del taglio.

Prima di venire tagliati i cervelli sono sottoposti ad un rapido processo di congelamento, che avviene sotto cappa a flusso laminare e che consiste nella loro immersione, per 40 secondi, in una soluzione di isopentano a -45°C . A questo punto, dopo un breve soggiorno a -80°C , si può procedere con il taglio al criostato, strumento che viene mantenuto ad una temperatura di lavoro costante di -20°C .

Il cervello viene posizionato su un opportuno piedistallo e ricoperto con un sottile strato di colla; passato il tempo necessario alla colla per seccarsi, il piedistallo viene inserito nell'apposito foro presente nello strumento e posizionato in modo tale che il taglio avvenga parallelamente alla lama sottostante.

Il tessuto è tagliato, fino alla fine della zona ippocampale in sezioni coronali di 30 µm che vengono conservate in free floating a -20°C, in una soluzione antigelo (etilene glicolico 30%, glicerolo 30% in PBSB) fino al momento dell'utilizzo per le valutazioni istologiche ed immunoistochimiche.

10.3 Cresyl violetto ed Ematossilina/Eosina

Il cresyl violetto, o colorazione di Nissl, è una colorazione istologica che mette in evidenza i neuroni vitali colorandoli di viola, mentre quelli morti o danneggiati rimangono bianchi.

Le fettine di cervello dei ratti sottoposti a 2VO, dopo essere state lavate in PBSB, vengono stese su vetrini gelatinizzati e reidratate in una soluzione di alcol al 70% per 1 minuto. I vetrini vengono immersi per 2 minuti nella soluzione di cresyl violetto (0,5% cresyl violetto acetato disciolto in acqua distillata, Fluka), deidratati tramite la serie ascendente degli alcol (70, 90 e 95% per 2 minuti ciascuno, 2 volte di 1 minuto in alcol 100%), passati per 2 minuti nello xilene e infine coperti, utilizzando come montante il Pertex (HistoLab), con il vetrino coprioggetto.

La colorazione con cresyl violetto (1%) è stata utilizzata anche per i ratti sottoposti a tMCAo per valutare il volume di danno ischemico cerebrale. Fettine cerebrali dello spessore di 30 µm, raccolte ad intervalli di 450 µm per 12 livelli per la lunghezza dello striato, sono state colorate ed il danno, che si presenta come una zona scura che riflette una alta concentrazione di nuclei appartenenti a cellule del cervello che proliferano i.e. cellule gliali, neuroni residui e cellule che hanno infiltrato l'area ischemica, è stato valutato.

Sezioni cerebrali delle stesse aree di interesse, sette giorni dopo tMCAo, sono state colorate anche con ematossilina/eosina. Le sezioni sono prima immerse per 2 minuti nel colorante ematossilina, che colora in blu violetto i componenti cellulari carichi negativamente come acidi nucleici, proteine di membrana e membrane cellulari

determinando una colorazione blu-viola del nucleo, e dopo lavaggio le sezioni sono immerse per 2 minuti in una soluzione di eosina, che colora invece in rosso rosato i componenti carichi positivamente determinando una colorazione rosata del citoplasma e degli spazi extracellulari. Nei ratti ischemici le sezioni così colorate mostrano una diminuzione nell'intensità della colorazione rispetto ai ratti sham-operated. Il pallore, dovuto all'aumento dei fluidi extracellulari e ad un aumento degli spazi interstiziali conseguentemente all'edema, è trovato in corteccia e striato. Il parenchima mostra numerosi nuclei piccoli ed eterocromatici in modo simile a quello trovato nelle sezioni colorate con cresyl violetto.

Le dodici sezioni colorate con cresyl violetto sono scannerizzate ed analizzate per valutare l'area di interesse utilizzando il programma ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). La misura diretta della zona di danno dell'emisfero controlaterale ed ipsilaterale, della corteccia e dello striato è calcolata in mm^3 come: (somma dell'area di interesse valutata nei 12 livelli) x (distanza fra i singoli livelli, 450 μm).

Le sezioni colorate con cresyl violetto e con ematossilina/eosina sono osservate con un microscopio ottico (Olympus BX40, milano, italia) e fotografate con la fotocamera digitale Nikon DS-Fi1.

11. ANALISI IMMUNOISTOCHIMICA

Gli animali sono stati sacrificati tramite decapitazione e ne è stato rapidamente rimosso il cervello, lo striato è stato dissezionato e fissato overnight, in una soluzione di paraformaldeide al 4% a 4°C; in seguito è stato messo in una soluzione di saccarosio al 30% in PBS per un giorno a 4°C per proteggere il tessuto durante il successivo congelamento in isopentano; la conservazione avviene ad una temperatura di -80°C. Sono state tagliate delle fettine in sezione trasversale dello spessore di 30 μm , disposte su vetrini e utilizzate per l'immunoistochimica. Le fettine sono state incubate in presenza dell'anticorpo primario (5 $\mu\text{g/mL}$) (Millipore Co. USA) ottenuto nel coniglio, overnight (O/N) a 4°C, diretto contro il trasportatore concentrativo di nucleosidi CNT2. Come anticorpo secondario è stato utilizzato Alexa Fluor 488

(Invitrogen, Oreon, USA) diretto contro l'anticorpo primario, diluito 1:330 per 120 minuti a temperatura ambiente. Le sezioni sono state osservate al microscopio a epifluorescenza (microscopio Zeiss Axioskop)

11.1 Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una tecnica di notevole sensibilità e specificità che permette di rivelare e interpretare la presenza di specifici antigeni all'interno di campioni di tessuto.

Nel modello 2VO, sono stati utilizzati l'anticorpo anti-MAG (Myelin Associated Glycoprotein, mouse, 1:250, Chemicon International), che mette in evidenza le glicoproteine associate alla mielina prodotta dagli oligodendrociti, e l'anticorpo anti-laminina (rabbit, 1:500, Gene Tex), che mette invece in evidenza la laminina, complesso glicoproteico extracellulare presente in quantità significativa sulla membrana basale delle cellule endoteliali ma anche di quelle nervose.

Le sezioni in free-floating vengono sottoposte ad un iniziale lavaggio di 10 minuti in PBSB-TX (PBSB e Triton X-100 0,3%) e successivamente mantenute, per circa 40 minuti, in agitazione debole e a temperatura ambiente, in una soluzione di bloccaggio (albumina bovina 5 mg/ml e sodio azide allo 0,05% diluiti in PBSB-TX). Tale soluzione ha il compito di neutralizzare i siti aspecifici di legame e quindi di ridurre il background. Le fettine sono a questo punto incubate, per tutta la notte, in debole agitazione e a temperatura ambiente, con l'anticorpo primario diluito nella soluzione di blocco.

Il giorno successivo, vengono fatti due lavaggi in PBSB-TX di 5 minuti ciascuno e poi, al buio, le sezioni sono incubate, per due ore, sempre in agitazione debole e a temperatura ambiente, con l'anticorpo secondario diluito anch'esso nella soluzione di blocco. L'anticorpo anti-MAG è stato legato con un anticorpo secondario verde IgG anti-topo (Vector Laboratoires, 1:400); l'anticorpo anti-laminina è stato legato ad un anticorpo secondario rosso IgG anti-coniglio (Vector Laboratoires, 1:400). Da questo momento in poi tutte le procedure devono essere eseguite in assenza di luce.

Le sezioni sono montate su vetrini gelatinizzati e, mediante alcune gocce di Vectashield (Vectastain, Vector Laboratoires), un montante che impedisce la

disidratazione del tessuto, coperte con i vetrini coprioggetto. Al termine dell'operazione si lascia asciugare il tutto all'aria.

I preparati sono stati osservati con un microscopio ad epifluorescenza (Olympus BX40, Amburgo, Germania), il cui raggio di eccitazione ha una lunghezza d'onda di 488-568 nm, e fotografati con una fotocamera digitale (Olympus DP50).

Le immagini ottenute sono state elaborate ed analizzate utilizzando il programma Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA, USA).

12. MICROSCOPIO ELETTRONICO

Gli animali sono stati sacrificati tramite decapitazione ed il cervello è stato rapidamente rimosso; lo striato è stato fissato e sezionato e la presenza del trasportatore concentrativo CNT2 è stata studiata con microscopia elettronica..

12.1 Microscopio elettronico convenzionale

Lo striato è stato immerso in una soluzione fissante con glutaraldeide (pH 7.4) per 6 ore; in seguito è stato lavato con una soluzione tamponante arricchita con saccarosio, e fissata con una soluzione buffer-fosfato OsO₄ (pH 7.4) per 2 ore. E' stato poi disidratato con alcohol, chiarificato in ossido di propilene e incluso in resina.

12.2 Immunolocalizzazione in microscopia elettronica

Lo striato è stato fissato per 60 minuti a temperatura ambiente con il fissativo PLP preparato immediatamente prima dell'uso mescolando un egual volume di paraformaldeide 8% in acqua distillata e 0,2 M di PBS (contenente 0,055 g/L NaIO₄ e 0,04 M di lisina), addizionata a 0,5% di glutaraldeide. Dopo il fissaggio il campione è stato lavato con PBS e pre-incubato in 0,1 M di PBS (pH7.4) e BSA 1% per 30 minuti a temperatura ambiente. A questo punto il campione è stato incubato in presenza dell'anticorpo primario di coniglio (5 µg/mL) diretto verso CNT2, in PBS e con 0,1% BSA O/N a 4°C. Dopo un lavaggio il campione è stato incubato con anticorpo

secondario anticoniglio coniugato con perossidasi di rafano biotinilata (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) 1:1000 in 1 M di PBS con BSA 0,1% per 90 minuti a temperatura ambiente. Il campione è stato in seguito sottoposto a lavaggi e trattato con il sistema avidina-biotina (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories) per 20 minuti, la reazione prodotta è stata sviluppata utilizzando diaminobenzidina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Per verificare la presenza di reazioni immunoistochimiche i campioni sono stati osservati al microscopio, e successivamente le aree selezionate sono state fissate con tampone fosfato OsO₄ 1% (pH 7.4) per 2 ore a temperatura ambiente, ricoperte con uranyl acetato in acqua distillata per 2 ore, e incluse come precedentemente descritto per il microscopio elettronico. Le sezioni sono state ottenute con l'utilizzo dell'ultra-microtomo LKB NOVA. Le fettine delle aree selezionate sono state ottenuto con lo stesso ultra-microtomo. Tutte queste fettine sono state analizzate al microscopio elettronico JEOL 1010, e poi fotografate.

13. ISOLAMENTO DELLE VESCICOLE SINAPTICHE

Le vescicole sinaptiche sono state isolate secondo una modifica della procedura descritta da Ohsawa e Uchizono (1975). I ratti maschi ceppo Wistar (270-300 gr) sono stati decapitati, il cervello, velocemente rimosso, è stato omogeneizzato in una soluzione 10% (w/vol) 0.32 M di saccarosio (1 mM MgCl₂, 5 mM Tris/HCl pH= 7.4), con aggiunta di inibitori delle fosfatasi: 100 mM di sodio pirofosfato (NaPP), 100 mM di sodio orto vanadato (Na₃VO₄), e di inibitori delle proteasi: 1 mg/ml di leupeptina e 30 µl/ml di aprotinina. Il cervello (1.25 g circa) è stato omogenato con otto colpi con un omogeneizzatore in teflon-vetro (Thomas Scientific, size AA) in ghiaccio. L'omogenato è stato centrifugato a 1000 g per 10 minuti a 4°C. Il pellet (P1) è stato scartato e il supernatante (S1) è stato nuovamente centrifugato a 11000 g per 30 minuti a 4°C. Il supernatante (S2) è stato scartato e il pellet (P2), contenente la frazione sinaptosomiale (Barker et al., 1972), è stato recuperato e sottoposto a shock osmotico con 2 ml di soluzione di lisi (1 mM di MgCl₂, 5 mM Tris/HCl pH= 7.4). Quest'ultimo

campione è stato stratificato su un gradiente discontinuo disposto su cinque strati consistenti in uguali volumi (2ml) di 0.05 M, 0.1 M, 0.15 M, 0.2 M e 0.3 M di saccarosio disciolto in una soluzione 1 mM MgCl₂, 5 mM Tris/HCl pH 7.4, e poi centrifugato a 65000 g per 100 minuti a 4°C. Sono state così ottenute otto frazioni che sono state ultracentrifugate a 105000 g per 20 minuti a 4°C. Il pellet (P3) di ogni campione è stato recuperato e sospeso in 80 µl di soluzione Tris/HCl pH= 7.4. Quest'ultimo campione è stato utilizzato per la quantificazione della sinaptofisina, marker molecolare specifico delle vescicole sinaptiche (Wiedenmann and Franke, 1985), attraverso Western blotting.

14. WESTERN BLOT DI SINAPTOFISINA E CNT2

La sinaptofisina, come marker della frazione vescicolare, è stata saggiata con western immunoblotting secondo il metodo descritto da Giovannini et al. (2001). Dopo l'isolamento, la determinazione delle proteine è stata eseguita in 3 µl per ogni campione usando il reagente Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Un volume appropriato di soluzione di carico (6x) è stata aggiunta agli omogenati, e i campioni sono stati bolliti per 5 minuti. I campioni (15 µg di proteine per pozzetto) sono stati caricati su un gel di SDS-PAGE all'8% e risolte da una elettroforesi standard. Le proteine sono poi state trasferite elettroforeticamente su una membrana di nitrocellulosa (Hybond-C extra; Amersham, Arlington Heights, IL, USA) usando un contenitore mantenuto ad una temperatura di 4°C, O/N con una corrente costante di 12 mA. Le membrane sono state incubate per un'ora a temperatura ambiente con soluzione bloccante (5% non fat dry milk in Tris Buffered Saline, 0.1%TWEEN-20, TBS-T), poi sono state incubate con l'anticorpo primario per la sinaptofisina (monoclonale di topo, 1:1000; Abcam, Cambridge, UK) O/N ad una temperatura di 4°C.

Dopo lavaggio in TBS-T, le membrane sono state incubate con anticorpo secondario anti-topo coniugato con perossidasi di rafano (1:3000, Thermo scientific, Rockford, IL), per un ora a temperatura ambiente. Le proteine sono state visualizzate usando la

chemiluminescenza (ECL, Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Allo scopo di normalizzare i valori della sinaptofisina, nella stessa analisi è stata rilevata anche la β -actina. Le membrane sono state strippate tramite una leggera agitazione con una soluzione di stripping (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) per 5 minuti a temperatura ambiente, incubate in soluzione bloccante per 1 ora a temperatura ambiente e incubate per 2 ore a temperatura ambiente con anticorpo anti β -actina (rabbit, 1:5000; Sigma, St Louis, MO). Successivamente le membrane sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente, con IgG anti-coniglio coniugate a perossidasi di rafano (1:3000; Thermo Scientific, Rockford, IL) e sviluppate come prima. Le bande sono state acquisite come files formato TIFF e l'analisi densitometrica delle bande è stata quantificata dal software ImageJ (NIH, Bethesda, MD). I valori di sinaptofisina sono stati espressi come percentuale di β -actina corsa nella stessa analisi di Western blot. La presenza del trasportatore concentrativo dei nucleosidi CNT2, nelle frazioni ricche in sinaptofisina della frazione cruda sinaptosomiale del cervello di ratto, è stata saggiata incubando le membrane con l'anticorpo primario (rabbit, 1:300; Millipore, Temecula, CA, USA) diretto contro CNT2 (78 kDa), O/N ad una temperatura di 4°C e mantenute in agitazione debole.

Dopo lavaggio in TBS-T, le membrane sono state incubate con anticorpo secondario anti-coniglio coniugato con perossidasi di rafano (1:3000, Thermo scientific, Rockford, IL), per una ora a temperatura ambiente in agitazione debole. Le proteine sono state visualizzate usando la chemiluminescenza. Le bande sono state acquisite come files formato TIFF.

15. ANALISI STATISTICA DEI DATI

Tutti i valori numerici sono espressi come media $\pm$ errore standard (SEM). I dati relativi ai diversi gruppi di animali sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza (ANOVA) ad una o a due vie, seguita dal test *post-hoc* di Bonferroni o di Newman-Keuls o Tukey's HSD, necessari per stabilire quanto ogni risultato è statisticamente significativo. Differenze con $p < 0.05$ risultano essere statisticamente significative.

Risultati

1. ESPERIMENTI SUL MODELLO DI OCCLUSIONE DELLE ARTERIE CAROTIDI COMUNI (2VO) CON SOMMINISTRAZIONE DI DIPIRIDAMOLO

Il protocollo sperimentale utilizzato in questi esperimenti prevede l'occlusione, per legatura, dell'arteria carotide comune destra e, una settimana dopo, l'occlusione della arteria carotide sinistra insieme all'impianto della mini-pompa osmotica. Il dipiridamolo o il veicolo sono rilasciati nel sangue per una settimana trascorsa la quale agli animali viene rimossa la mini-pompa osmotica. Dopo 30, 60 e 90 giorni la 2VO, i ratti sono sottoposti a test comportamentali ed infine sacrificati mediante perfusione transcadiaca (Fig. 20).



Figura 20. Schema del protocollo sperimentale seguito negli esperimenti di ipoperfusione cerebrale cronica.

1.1 Valutazione del deficit neurologico mediante Esame Obiettivo Neurologico (EON)

Nella valutazione delle capacità sensori-motorie tutti gli animali hanno ottenuto, due settimane prima dell'occlusione bilaterale, il punteggio massimo. Nei ratti sham-operated tale punteggio non è cambiato significativamente nel tempo, mentre negli animali veicoli e nei trattati con il dipiridamolo questo si è ridotto sia a 60 che a 90 giorni dall'operazione (Fig. 21).

L'analisi della varianza a due vie calcolata per i due fattori tipo di trattamento e giorni di distanza dall'occlusione, ha mostrato che le capacità sensoriali e motorie degli animali sono influenzate in modo significativo dal tempo trascorso a partire dall'operazione, dal tipo di trattamento, ma non da un'azione sinergica dei due. Il test

post hoc di Bonferroni ha poi permesso di concludere che il punteggio ottenuto dai veicoli si è significativamente ridotto, in confronto a quello degli sham-operated, a 60 e 90 giorni dall'operazione. Per quanto riguarda i punteggi degli animali trattati con il dipiridamolo, questi si sono ridotti in modo significativo sia a 60 che a 90 giorni dall'occlusione.

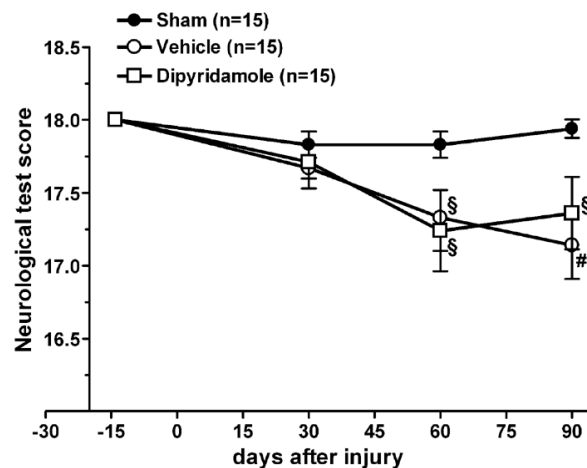


Figura 21. Variazione del punteggio neurologico ottenuto mediante EON degli animali sham-operated (●), veicoli (○) e trattati con dipiridamolo (□). Per ciascun gruppo di ratti è riportata, sia per i 14 giorni prima, che per i 30, 60 e 90 dopo l'intervento, la media $\pm$ E.S. Analisi della varianza a due vie seguita dal test post hoc di Bonferroni: [#]P<0.01 vs sham-operated; [§]P<0.05 vs sham-operated.

1.2 Valutazione della memoria non spaziale mediante Object Recognition Test (ORT)

La memoria non spaziale degli animali, valutata tramite il test dell'Object Recognition, è stata espressa come media degli indici di discriminazione (DI) ottenuti dai ratti di ogni gruppo per ciascuna sessione sperimentale (Fig. 22).

Il DI tende a diminuire nei ratti trattati con il veicolo, dopo 30 giorni dall'occlusione, tornando poi ai valori normali. L'analisi della varianza a due vie calcolata per i due fattori tipo di trattamento e tempo, ha mostrato che l'indice non viene influenzato in maniera significativa né dal gruppo di appartenenza degli animali, né dal tempo trascorso. Non è riscontrabile alcuna interazione sinergica tra le due variabili indipendenti.

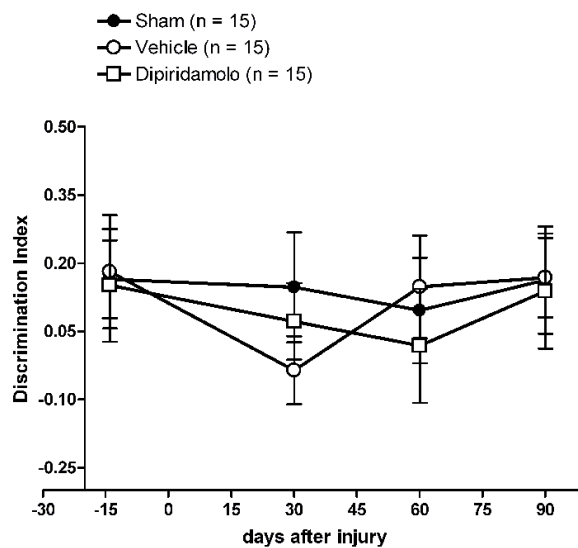


Figura 22. Variazione del DI dei ratti sham-operated (●), veicoli (○) e trattati con dipiridamolo (□). Per ciascun gruppo di ratti è riportata, sia per i 14 giorni prima, che per i 30, 60 e 90 dopo l'intervento, la media $\pm$ E.S.

1.3 Valutazione della memoria spaziale mediante Y Maze Test

La memoria spaziale, valutata tramite l'Y Maze Test, è stata espressa come media delle percentuali di alternanza ottenuta dai ratti di ciascun gruppo per ciascuna sessione sperimentale (Fig. 23).

I ratti trattati con il veicolo hanno mostrato un peggioramento della memoria spaziale sia a 60 giorni che a 90 giorni dall'operazione, mentre quelli trattati con il dipiridamolo hanno mostrato un peggioramento solo dopo 60 giorni dall'occlusione, e non più a 90.

L'analisi della varianza a due vie calcolata per i due fattori tipo di trattamento e giorni di distanza dall'occlusione ha evidenziato che la memoria spaziale viene influenzata significativamente solo dal tipo di trattamento ma non dal tempo trascorso dall'occlusione. Non è inoltre riscontrabile alcuna interazione tra le due variabili indipendenti.

Il test post hoc di Bonferroni ha mostrato che, rispetto alla percentuale di alternanza dei ratti sham-operated, quella degli animali veicoli si è significativamente ridotta a 60 e 90 giorni dall'intervento ($P < 0.05$), mentre quella dei ratti trattati con il dipiridamolo

solo a 60 giorni ($P<0.05$). Dopo 90 giorni, infatti, la percentuale di alternanza degli animali trattati non si differenzia da quella dei ratti sham-operated. Esiste infatti una differenza significativa ($P<0.05$) tra la percentuale di alternanza dei ratti trattati con dipiridamolo e quella degli animali a cui è stato somministrato solo il veicolo.

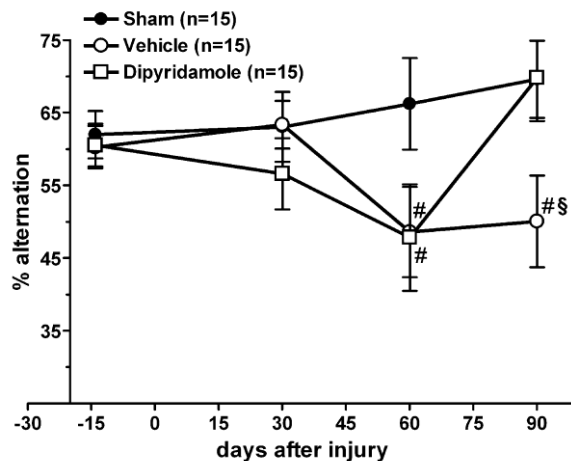


Figura 23. Variazione della percentuale di alternanza degli animali sham-operated (●), veicoli (○) e trattati con dipiridamolo (□). Per ciascun gruppo di ratti è riportata, sia per i 14 giorni prima, che per i 30, 60 e 90 giorni dopo l'intervento, la media $\pm$ E.S. Analisi della varianza a due vie seguita dal test post hoc di Bonferroni: [#] $P<0.05$ vs sham-operated; [§] $P<0.05$ vs trattati con dipiridamolo.

1.4 Valutazione istologica ed immunoistochimica

L'analisi istologica ed immunoistochimica delle sezioni cerebrali è stata eseguita tre mesi dopo 2VO.

Con l'analisi istologica eseguita mediante colorazione con cresyl violetto non è stata riscontrata alcuna differenza nell'intensità della colorazione tra gli animali sham-operated, i veicoli ed i trattati con il dipiridamolo. Le cellule cresyl violetto positive (cellule vitali) sono presenti selettivamente nell'area CA1 e nel giro dentato dell'ippocampo (Fig. 24).

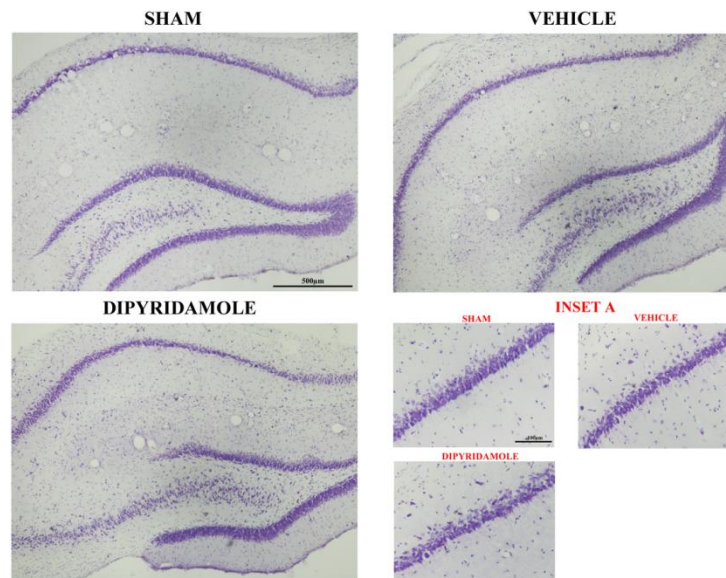


Figura 24. Immagine rappresentativa della colorazione istologica di Nissl. In violetto sono colorate le cellule vitali. In “INSET A” è mostrato un dettaglio della regione CA1 dell’ippocampo nei tre gruppi di animali.

L’analisi immunoistochimica eseguita utilizzando l’anticorpo diretto contro le glicoproteine associate alla mielina (MAG) non mostra alcuna differenza di colorazione tra i tre gruppi di animali (Fig. 25).

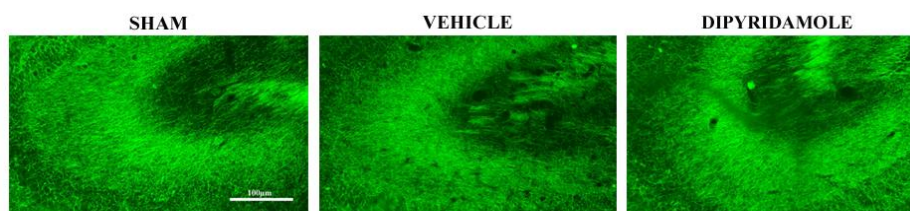


Figura 25. Immagine rappresentativa della colorazione immunoistochimica di MAG della regione CA2 dell’ippocampo nei tre gruppi di ratti.

Le fettine di cervello dei tre gruppi di animali sono state trattate anche con un anticorpo diretto contro la laminina, complesso glicoproteico abbondante sulla membrana basale delle cellule endoteliali e nervose e per questo utilizzato per valutare sia la densità vascolare che la fine matrice extracellulare che circonda il tessuto

nervoso (Fig. 26). L'analisi densitometrica della fluorescenza non ha riportato differenze significative tra i tre gruppi di animali.

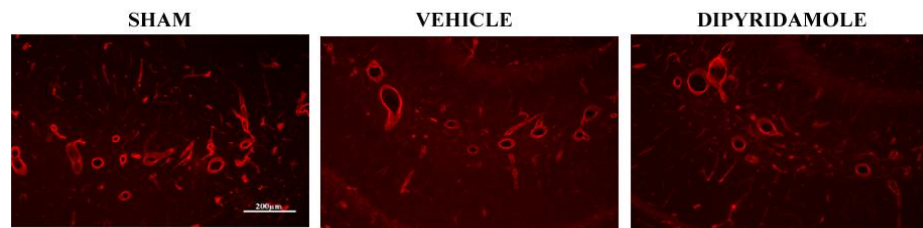


Figura 26. Immagine rappresentativa della colorazione immunoistochimica della laminina nell'ippocampo dei tre gruppi di ratti.

Le sezioni dei cervelli dei ratti, appartenenti ai tre gruppi, sono state marcate con l'anticorpo primario anti-IBA 1, per visualizzare le cellule della microglia, e non mostrano differenze di espressione tra gli animali sham-operated, trattati con veicolo e trattati con dipiridamolo (Fig. 27).

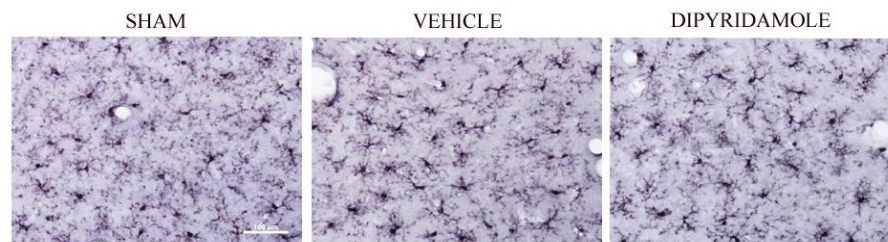


Figura 27. Immagine rappresentativa della colorazione immunoistochimica di IBA 1 nella regione dell'ippocampo nei tre gruppi di ratti.

2. ESPERIMENTI SUL RILASCIO DI ATP ED ADENOSINA, IN CONDIZIONI NORMOSSICHE ED ISCHEMICHE, DALLO STRIATO DI RATTO

2.1 Valutazione del deficit neurologico e del danno ischemico 24h dopo MCAo

In tabella 2 sono riportati i punteggi neurologici, ottenuti in seguito al test EON, dei tre gruppi di animali 24 h dopo occlusione. Il punteggio neurologico è ridotto significativamente del 51% nei ratti ischemici trattati con veicolo rispetto ai ratti sham-operated e non subisce modifiche rispetto ai ratti ischemici trattati con POM4 (100 μ M). Ventiquattro ore dopo MCAo è calcolato il danno cerebrale ischemico, mediante colorazione con cresil violetto, nelle regioni più sensibili alla MCAo, striato e corteccia. In tabella 2 sono riportati i volumi di danno in mm³ sia in corteccia che in striato. E' stato valutato che nei ratti ischemici trattati con veicolo, la media percentuale del danno ischemico, calcolato in relazione al volume dell'emisfero ipsilaterale è: $9.8 \pm 1.2\%$ in striato e $27.0 \pm 3.1\%$ in corteccia. Nei ratti ischemici trattati con POM4 (100 μ M), la media percentuale del danno ischemico è: $13.2 \pm 2.01\%$ in striato e $30.0 \pm 6.5\%$ in corteccia. Non risultano differenze statisticamente significative tra i due gruppi di animali. Nell'emisfero controlaterale e nei ratti sham-operated non è stato trovato danno ischemico.

Tabella 2.

Trattamento	Punteggio neurologico	Danno corticale (mm³)	Danno striatale (mm³)
Ratti trattati con veicolo (n=5)	8.60±1.03	81.5±11.2	29.4±4.3
Ratti trattati con POM4 (n=9)	8.11±0.77	80.7±14.2	35.4±4.2
Ratti sham-operated (n=4)	17.5±0.29*	0	0

I dati sono la media±E.S. di “n” ratti per gruppo. Il volume dell’emisfero ipsilaterale era (media±E.S.): 251.1±14.3 mm³ nei ratti ischemici trattati con veicolo e 230.7±12.4 mm³ nei ratti ischemici trattati con il POM4 (100 µM). Analisi della varianza ANOVA ad una via seguita dal test di comparazione multipla di Newman-Keuls: *p<0.001 vs ratti ischemici trattati con veicolo e trattati con POM4 (100 µM).

2.2 Effetto degli inibitori delle ecto-ATPasi, POM-4 (100 µM) e BGO136 (50 mM), sul rilascio di ATP e adenosina nello striato di ratto in condizioni normossiche.

Nei ratti ischemici trattati con veicolo, il rilascio di ATP ed adenosina rimane costante per tutto il periodo della raccolta dei campioni. In seguito all’applicazione dell’inibitore selettivo delle ecto-ATPasi (barra sulle ascisse), POM-4 (100 µM), il rilascio di ATP aumenta progressivamente e raggiunge un picco massimo dopo 180 min (circa 11 volte in più rispetto al periodo pre-farmaco). In presenza di BGO136 (50 mM), il rilascio di ATP, aumenta subito dopo l’applicazione del farmaco e raggiunge il picco massimo dopo 60 min con un aumento di circa 7 volte rispetto al periodo pre-farmaco e poi diminuisce raggiungendo un plateau (Fig. 27).

Il rilascio di adenosina non si modifica in maniera statisticamente significativa dopo l’applicazione dei farmaci POM-4 (100 µM) e BGO136 (50 mM) rispetto ai ratti ischemici trattati con soluzione Ringer (Fig. 28).

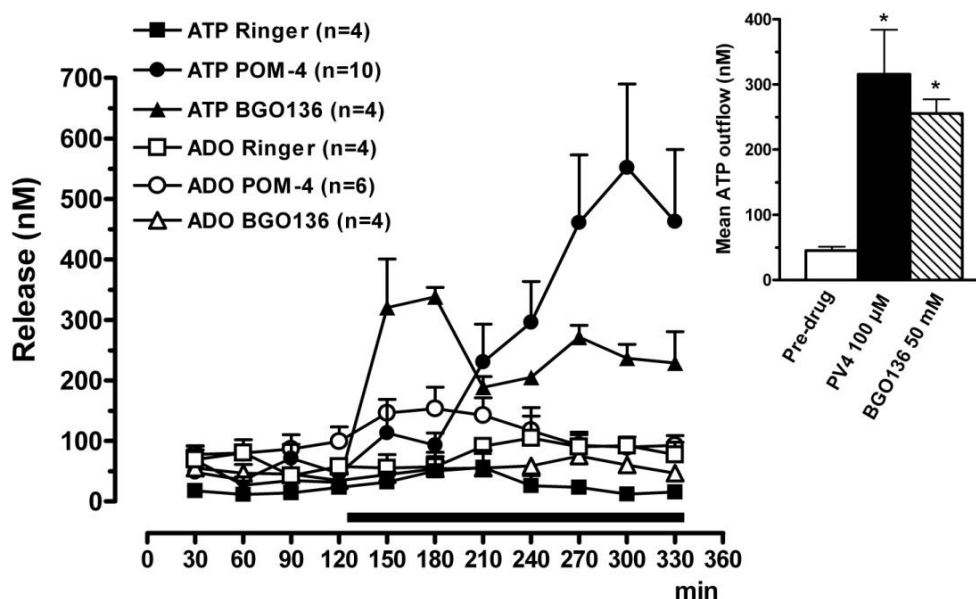


Figura 28. Effetto di POM-4 (100 μ M) e BGO136 (50 mM) sul rilascio di adenosina ed ATP nello striato di ratti in condizioni normossiche.

Time-course del rilascio di adenosina e ATP prima e dopo l'applicazione del farmaco. I livelli di adenosina e ATP sono espressi in valore assoluto (nM) e corretti per il recupero dei probe. Ogni punto è la media $\pm$ E.S. di "n" ratti per gruppo. La presenza di POM4 o BGO136 nella soluzione perfundente è indicata dalla barra sopra l'asse delle ascisse.

Nell'inserto è mostrata la media del rilascio di ATP calcolata prima (da 30 a 120 min) e dopo (da 150 a 330 min) l'applicazione del farmaco. Colonna bianca: media del rilascio pre-farmaco (da 30 a 120 min); colonna nera: media del rilascio indotto da POM4 (da 150 a 330 min); colonna a linee: media del rilascio indotto da BGO136 (da 150 a 330 min). Analisi della varianza ANOVA ad una-via seguita dal test di comparazione multipla di Newman-Keuls: * $p < 0.01$ vs rilascio pre-farmaco.

2.3 Effetto di dipiridamolo (100 μ M), inibitore dei trasportatori equilibrativi dei nucleosidi (ENT), in presenza di POM-4 (100 μ M) sul rilascio di adenosina nello striato di ratto in condizioni normossiche.

Gli esperimenti descritti al paragrafo 2.2 dimostrano che in condizioni normossiche il rilascio di adenosina non dipende dalla degradazione di ATP ma che adenosina deriva come tale dalla cellula poiché, in presenza di POM-4 o di BGO136, le concentrazioni extracellulari di adenosina non variano rispetto a quelle dei ratti veicolo non trattati. Negli esperimenti seguenti abbiamo utilizzato come inibitore delle ectonucleotidasi solo POM-4 in quanto più efficace e sicuramente non interferente con il dosaggio di ATP. Quindi per verificare se, in condizioni normossiche, in presenza di POM-4

adenosina sia rilasciata mediante i trasportatori equilibrativi (ENT), abbiamo utilizzato un efficace inibitore di questa famiglia di trasportatori: il dipiridamolo.

Il dipiridamolo (100 μ M) è stato somministrato insieme al POM-4. In seguito alla somministrazione dei farmaci (barra nera sopra l'asse della ascisse), il rilascio di adenosina ha avuto un progressivo aumento fino a raggiungere un plateau dopo circa 180 minuti. Questo incremento è risultato essere di circa tre volte maggiore rispetto al periodo precedente alla somministrazione dei farmaci (Fig. 29). Il grafico a barre in figura mostra che la media percentuale del rilascio di adenosina nei ratti trattati con POM-4 più dipiridamolo, è aumentata significativamente, rispetto ai ratti trattati solo con POM-4 e ai ratti trattati con veicolo ($p<0.0001$).

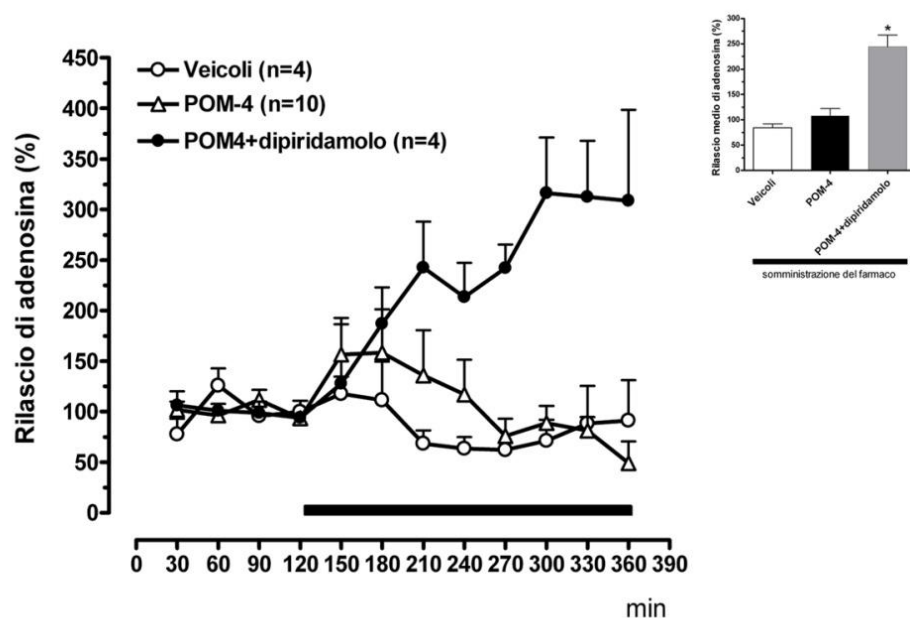


Figura 29. Time-course del rilascio di adenosina prima e dopo la somministrazione del farmaco.

I risultati sono espressi come la media $\pm$ ES di "n" ratti, rappresentano la variazione percentuale del valore basale, calcolata come la media dei primi quattro campioni. $\circ$ ratti veicoli; Δ ratti trattati con POM 4; $\bullet$ ratti trattati con POM-4(100 μ M)+dipiridamolo (100 μ M).

Inset: grafico a barre mostra la media delle variazioni percentuali del rilascio di adenosina, calcolata durante la somministrazione del farmaco. Colonna bianca: ratti veicoli; colonna nera: ratti trattati con POM 4; colonna grigia: ratti trattati con POM 4+dipiridamolo. One-way ANOVA seguito da test di comparazione Newman-Keuls: * $p<0.0001$ vs tutti gli altri gruppi di ratti.

2.4 Localizzazione del trasportatore concentrativo dei nucleosidi (CNT2) sui neuroni nello striato e sulle vescicole sinaptiche

La presenza del trasportatore concentrativo dei nucleosidi (CNT2) a livello dello striato di ratto è stata determinata, mediante colorazione immunoistochimica, in numerosi neuroni localizzati intorno ai “*fascicula*” dello striato (Fig. 30). Il CNT2 è distribuito nell'intero citoplasma con un gradiente di intensità dalla porzione perinucleare verso la periferia cellulare (inset in Fig. 30). La marcatura ha un aspetto granulare. Il CNT2 è presente anche in numerose fibre neuronali che mostrano un profilo varicoso. A livello delle varicosità la marcatura è più intensa.

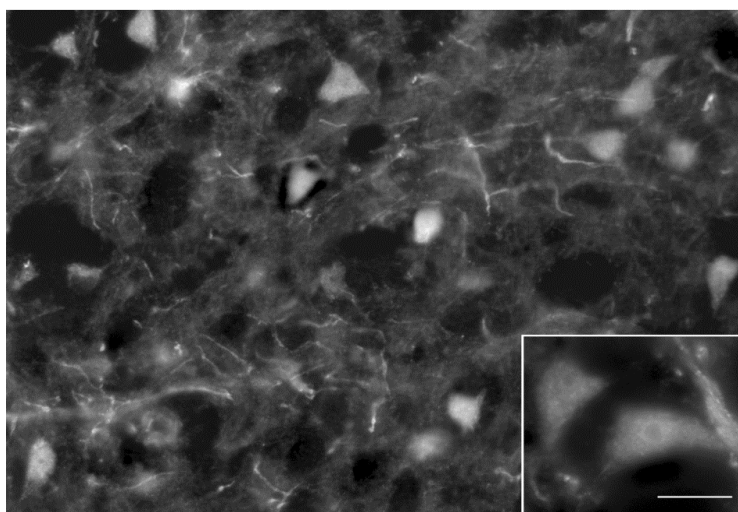


Figure 30. Immunoreattività (IR) per il CNT2 (CNT2-IR) nello striato di ratto. CNT2-IR è presente in vari soma neuronali e fibre nervose che mostrano un profilo varicoso. Nell'inset sono mostrati due neuroni ed un piccolo fascio di fibre nervose intensamente marcati. Da notare: nel neurone la colorazione è particolarmente intensa in stretta vicinanza al nucleo, regione comunemente occupata dall'apparato di Golgi. Scala A,B=50 μ m, Inset=25 μ m.

L'osservazione al microscopio elettronico mostra la presenza del CNT2 lungo le membrane delle terminazioni nervose e sulle membrane delle vescicole sinaptiche (Fig. 31A). In fig. 31B è mostrato un particolare di un neurone, in prossimità dell'apparato del Golgi, dove sono presenti vescicole marcate con CNT2.

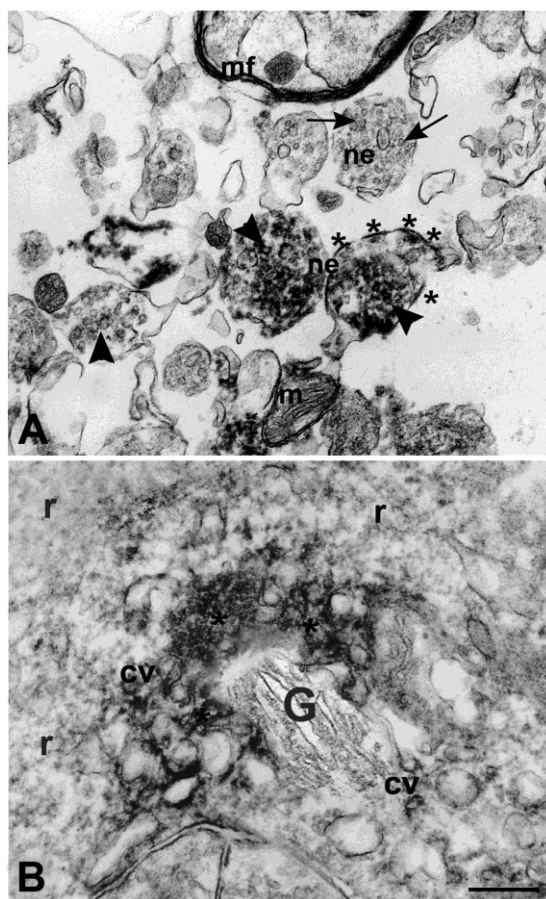


Figure 31. Immunolocalizzazione del CNT2 mediante microscopia elettronica nei neuroni dello striato di ratto. **A)** Marcatura positiva per CNT2 è presente in alcune terminazioni nervose (ne) lungo il contorno delle vescicole (punte della freccia) e sulla membrana plasmatica (asterisco). Le frecce indicano vescicole non marcate. **B)** Marcatura per il CNT2 è presente nella regione corrispondente all'apparato del Golgi (G) particolarmente concentrata sulle vescicole rivestite (cv) che escono dalle cisterne del Golgi. m=mitocondri, mf=fibre mieliniche, r=ribosomi. Bar: A=0.2 μ m, B=0.08 μ m.

Per verificare ulteriormente la presenza del CNT2 sulle vescicole sinaptiche è stato eseguito un frazionamento da cervello di ratto allo scopo di isolare le frazioni subcellulari ricche in sinaptofisina, marker molecolare delle membrane delle vescicole sinaptiche (Wiedenmann and Franke, 1985). Nelle frazioni ricche in sinaptofisina è stato valutato la presenza del CNT2 mediante la tecnica di western blot. La figura 32 dimostra che il trasportatore CNT2 che si localizza in due frazioni della frazione cruda sinaptosomiale (P2) ricche in sinaptofisina. La banda del CNT2 ha un apparente peso molecolare nel range tra 75 e 105 kDa, in accordo con Valdés e collaboratori (2000).

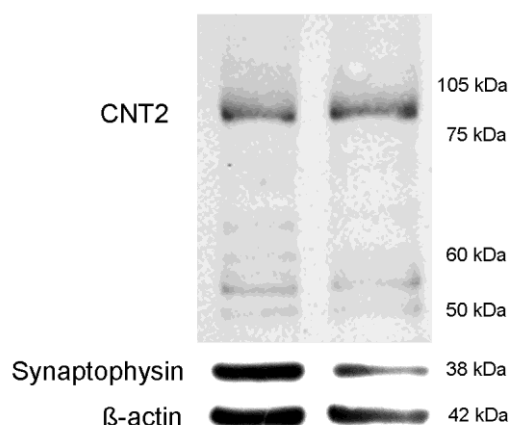


Figure 32. CNT2-immunoblotting nella frazione cruda sinaptosomiale del cervello di ratto. Un blot rappresentativo dell'espressione di CNT2 nelle frazioni ricche in sinaptofisina della frazione cruda sinaptosomiale del cervello di ratto.

2.5 Effetto dell'inibitore delle ecto-ATPasi, POM-4 (100 μ M), sul rilascio di ATP ed adenosina nello striato di ratto prima e dopo ischemia.

In figura 33 è riportato il time course dell'effetto dell'inibitore delle ecto-ATPasi, POM-4 (100 μ M) sul rilascio di adenosina nello striato di ratti durante normossia ed in seguito ad ischemia. Nei ratti sham-operated i livelli extracellulari di adenosina rimangono costanti per l'intero periodo di raccolta dei campioni e non risultano modificati dalla perfusione con POM-4 (100 μ M). Nei ratti ischemici trattati con veicolo, MCAo porta ad un rapido incremento nei livelli di adenosina, il picco massimo si raggiunge 45 min dopo ischemia ed è aumentato di circa 9 volte rispetto ai livelli pre-ischemici. Nei ratti ischemici trattati con POM-4 (100 μ M) in seguito ad MCAo, i livelli di adenosina sono significativamente ridotti rispetto ai ratti ischemici trattati con veicolo. Il picco massimo si ha 115 min dopo MCAo ed è aumentato di 3 volte rispetto ai livelli di adenosina pre-ischemici.

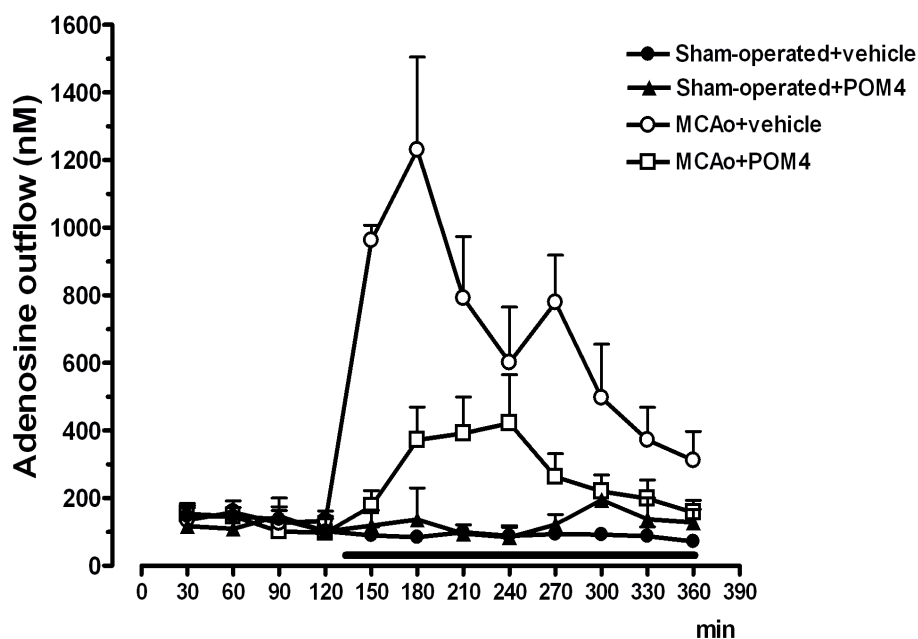


Figura 33. Effetto di POM-4 (100 μ M) sul rilascio di adenosina nello striato di ratto durante MCAo permanente. I livelli di adenosina, corretti per il recupero della membrana da microdialisi, sono espressi in valore assoluto (nM). Ogni punto è la media $\pm$ E.S. di “n” ratti per gruppo (vedi Tabella 3). MCAo è indicata dalla barra sopra l’asse delle ascisse. Le medie del rilascio di adenosina sono riportate in tabella 3.

In figura 34 è riportato il time course dell’effetto dell’inibitore delle ecto-ATPasi, POM-4 (100 μ M), sul rilascio di ATP nello striato di ratti durante normossia ed in seguito ad ischemia. Nei ratti sham-operated i livelli extracellulari di ATP rimangono costanti per l’intero periodo di raccolta dei campioni e non sono modificati da POM-4 (100 μ M). Nei ratti ischemici trattati con veicolo, ATP aumenta più lentamente rispetto ad adenosina. Il picco massimo di rilascio di ATP si raggiunge 105 min dopo ischemia ed è aumentato di circa 2.8 volte rispetto ai livelli pre-ischemici. Nei ratti ischemici trattati con POM-4 (100 μ M), i livelli di ATP sono definitivamente aumentati. In presenza di POM-4 i livelli di ATP raggiungono, 15 minuti dopo ischemia, un picco di 1.8 volte maggiore rispetto ai livelli pre-ischemici.

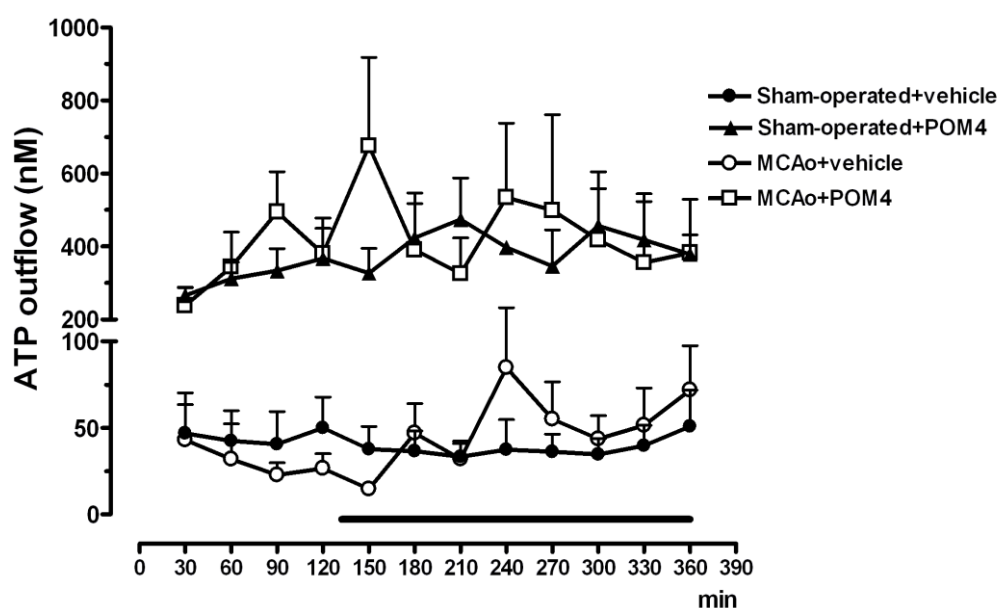


Figura 34. Effetto di POM-4 (100 μ M) sul rilascio di ATP nello striato di ratto durante MCAo permanente. I livelli di ATP sono espressi in valore assoluto (nM) e corretti per il recupero dei probe. Ogni punto è la media $\pm$ E.S. di “n” ratti per gruppo (vedi Tabella 3).

MCAo è indicata dalla barra sopra l’asse delle ascisse.
Le medie del rilascio di ATP sono riportate in tabella 3.

In figura 35 il contributo di ATP extracellulare alla formazione di adenosina extracellulare è riportato in un grafico che rappresenta il rapporto tra le concentrazioni di adenosina extracellulare/intracellulare. La concentrazione extracellulare di adenosina misurata nei ratti trattati con POM-4 (100 μ M) (quando l’idrolisi di ATP extracellulare è bloccata), corrisponde alla parte di adenosina derivata *per se* dalla cellula (adenosina intra). Sottraendo dalla concentrazione totale di adenosina extracellulare (rilascio di adenosina misurato nei ratti trattati con veicolo) la parte di adenosina derivata come tale, otteniamo la parte di adenosina extracellulare derivata dall’idrolisi di ATP extracellulare (adenosina extra).

Durante il periodo normossico, il rapporto della concentrazione di adenosina extra/intra è intorno allo zero (a), indicando che tutta l’adenosina extracellulare deriva dal compartimento intracellulare. Durante i primi 20 minuti dopo ischemia (b), il massimo rapporto di 4,5 indica che l’adenosina extracellulare deriva in gran parte dall’idrolisi di ATP extracellulare. Nei tempi successivi (c) il rapporto tra adenosina extra/intra tende

a decrescere raggiungendo un valore intorno ad 1 tra 110 e 230 minuti dopo ischemia, indicando che a questo tempo adenosina deriva in ugual misura dall'idrolisi di ATP e come tale dalla cellula.

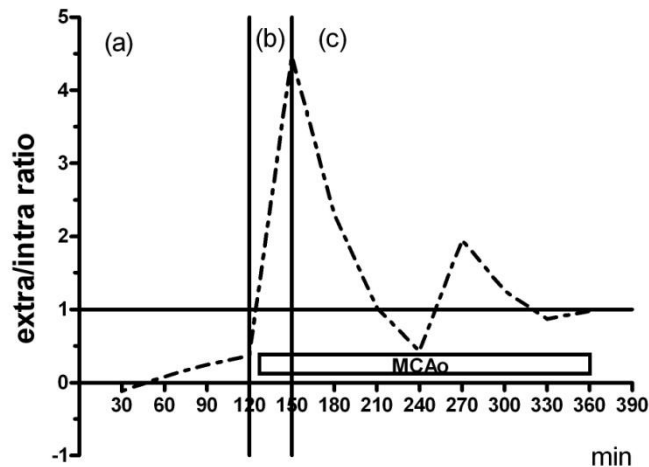


Figura 35. Time-course del rapporto di adenosina extracellulare/intracellulare. (a) periodo normossico, (b) e (c) periodo ischemico.

2.6 Medie delle concentrazioni di adenosina e ATP, in presenza dell'inibitore delle ecto-ATPasi, POM-4 (100 μ M), prima e dopo MCAo.(Tabella 3)

In condizioni normossiche, il POM-4 (100 μ M) aumenta significativamente la media della concentrazione extracellulare di ATP (364.2 ± 52.8 nM nei ratti MCAo e 320.0 ± 21.2 nM nei ratti sham-operated) rispetto alla concentrazione di ATP dei ratti trattati con veicolo (31.1 ± 4.2 nM e 45.0 ± 2.1 nM), ma non modifica in maniera statisticamente significativa la media del rilascio di adenosina nei ratti trattati con POM-4 (100 μ M) (125.0 ± 14.6 nM nei ratti MCAo e 119.1 ± 7.2 nM nei ratti sham-operated) rispetto ai ratti trattati con veicolo (138.55 ± 2.00 nM e 133.6 ± 3.7 nM).

L'analisi della varianza ANOVA ad una via mostra una differenza significativa nel rilascio medio di ATP tra i quattro gruppi di ratti in condizioni normossiche ($p < 0.0001$). Il test di comparazione multipla di Newman-Keuls dimostra che la media della concentrazione di ATP in normossia nei ratti trattati con POM-4 (100 μ M) è aumentata rispetto alla concentrazione trovata nei ratti trattati con veicolo e nei ratti sham-operated ($p < 0.001$).

Durante ischemia la media della concentrazione extracellulare di ATP nei ratti ischemici trattati con veicolo (50.0 ± 7.7 nM) è aumentata di 1.6 volte rispetto alla media durante normossia (31.1 ± 4.2 nM) (Paired Student's t test: $p < 0.03$). La media del rilascio di ATP durante ischemia, misurata nei ratti ischemici perfusi con POM-4 (100 μ M) (447.8 ± 40.9 nM nei ratti MCAo), è aumentata di 9 volte rispetto alla media di ATP trovata nei ratti ischemici trattati con veicolo (50.0 ± 7.7 nM) e di 12 volte rispetto alla media di ATP trovata nei ratti sham-operated (38.3 ± 1.9 nM). L'analisi della varianza ANOVA ad una via mostra una differenza significativa nel rilascio medio di ATP tra i tre gruppi di ratti in condizioni ischemiche ($p < 0.0001$). Il test di comparazione multipla di Newman-Keuls dimostra che la media della concentrazione di ATP in ischemia nei ratti trattati con POM-4 (100 μ M) è aumentata rispetto alla concentrazione trovata nei ratti trattati con veicolo e nei ratti sham-operated ($p < 0.001$). Il rilascio medio di adenosina, dopo MCAo, nei ratti ischemici perfusi con veicolo (693.3 ± 109.7 nM) è aumentato di 5 volte rispetto alla media di adenosina durante normossia (138.5 ± 2.0 nM) (Paired Student's t test: $p < 0.02$) ed è ridotto di 2,5 volte nei ratti perfusi con POM-4 (100 μ M) (275.4 ± 37.1 nM), indicando che il blocco della degradazione di ATP influisce sui livelli extracellulari di adenosina, per cui durante ischemia una parte di adenosina deriva dalla degradazione di ATP. L'analisi della varianza ANOVA ad una via mostra una differenza significativa nel rilascio medio di adenosina tra i tre gruppi di ratti in condizioni ischemiche ($p < 0.001$). Il test di comparazione multipla di Newman-Keuls dimostra che la media della concentrazione di adenosina, dopo ischemia, nei ratti ischemici trattati con POM-4 (100 μ M) è significativamente ridotta rispetto alla concentrazione di adenosina trovata nei ratti ischemici trattati con veicolo ($p < 0.001$). Inoltre, la media della concentrazione di adenosina nei ratti ischemici trattati con veicolo è aumentata rispetto alla media delle concentrazioni di adenosina nei ratti sham-operated ($p < 0.001$).

Tabella 3. Effetto di POM-4 sul rilascio di adenosina e ATP, nello striato di ratti, in condizioni normossiche e ischemiche.

		Rilascio in condizioni normossiche	Rilascio in condizioni ischemiche
ATP (nM)	Sham-operated+veicolo (n=4)	45.0±2.1	38.3±1.9
	Sham-operated+POM-4 (n=3)	320.0±21.2 [#]	402.8±18.1 [§]
	MCAo+veicolo (n=4)	31.1±4.2	50.0±7.7 [°]
	MCAo+POM-4 (n=6)	364.2±52.8 [#]	447.8±40.9 [§]
Adenosine (nM)	Sham-operated+vehicle (n=4)	133.6±3.7	88.6±2.9
	Sham-operated+POM-4 (n=3)	119.1±7.2	124.2±15.5
	MCAo+veicolo (n=5)	138.5±2.0	693.3±109.7 ^{†*}
	MCAo+POM-4 (n=10)	125.0±14.6	275.4±37.1 [%]

Il rilascio di adenosina e ATP è espresso come media±E.S. di “n” ratti per gruppo nel periodo normossico da 0 a 120 min e dopo ischemia da 150 a 360 min (Fig. 32 e 33). Tutti i valori sono corretti per il recupero dei probe.

Test T di Student accoppiato sul rilascio valutato in condizioni normossiche vs periodo ischemico per ogni gruppo di ratti: [°]p<0.03 vs ATP in condizioni normossiche dei ratti MCAo trattati con veicolo; [†]p<0.02 vs adenosina in condizioni normossiche dei ratti MCAo trattati con veicolo; [%]p<0.02 vs adenosina in condizioni normossiche dei ratti MCAo trattati con POM-4.

ANOVA ad una via seguita dal test di comparazione multipla di Newman-Keuls: [#]p<0.001 vs ATP in condizioni normossiche dei ratti trattati con veicolo; [§]p<0.001 vs ATP in condizioni ischemiche dei ratti trattati con veicolo; *p<0.001 vs adenosina in condizioni ischemiche dei ratti MCAo trattati con POM-4, ratti sham-operated trattati con POM-4 e ratti sham-operated trattati con veicolo.

3. ESPERIMENTI SUL MODELLO DI OCCLUSIONE TRANSIENTE DELL'ARTERIA CEREBRALE MEDIA (tMCAo) CON SOMMINISTRAZIONE DI SCH58261

3.1 Valutazione del deficit motorio e sensoriale prima e dopo tMCAo

I dati riportati in figura 36 rappresentano la media del punteggio ottenuto dai ratti di ogni gruppo dopo essere stati sottoposti al test mNSS prima dell'operazione, 1 giorno, 5 giorni e 7 giorni dopo l'occlusione transiente. I ratti sham-operated hanno un punteggio neurologico nel range di 0.15-0.70 tra 1 e 7 giorni dopo tMCAo. Ventiquattro ore dopo ischemia transiente i ratti trattati con veicolo mostrano uno score neurologico di 12.6 ± 0.5 , indice di forte danno. Cinque giorni dopo tMCAo il punteggio dei ratti trattati con veicolo si riduce spontaneamente a 8.2 ± 0.7 e sette giorni dopo si riduce a 7.0 ± 0.6 . Il trattamento con l'antagonista selettivo dei recettori A_{2A} di adenosina, SCH58261, somministrato cronicamente via intraperitoneo alla dose di 0,01 mg/kg, 2 volte al giorno per i sette giorni successivi a tMCAo, migliora in maniera statisticamente significativa il deficit neurologico rispetto al gruppo di animali trattati con veicolo un giorno dopo tMCAo ma non più cinque e sette giorni dopo tMCAo. L'analisi della varianza a due vie calcolata per i due fattori trattamento e tempo dopo tMCAo mostra che il fattore trattamento ($F_{2,80}=173.5$; $p<0.0001$), tempo ($F_{3,80}=112.3$; $p<0.0001$) e l'interazione ($F_{6,80}=25.22$; $p<0.0001$) sono statisticamente significativi. Il test post hoc di Bonferroni indica che il punteggio neurologico dei ratti sham-operated è statisticamente diverso rispetto sia ai ratti ischemici trattati con veicolo sia ai ratti ischemici trattati cronicamente con SCH58261 ($p<0.001$) e il deficit neurologico dei ratti ischemici trattati con SCH58261 è statisticamente diverso ($p<0.05$) rispetto ai ratti ischemici trattati con veicolo, dopo 1 giorno da tMCAo.

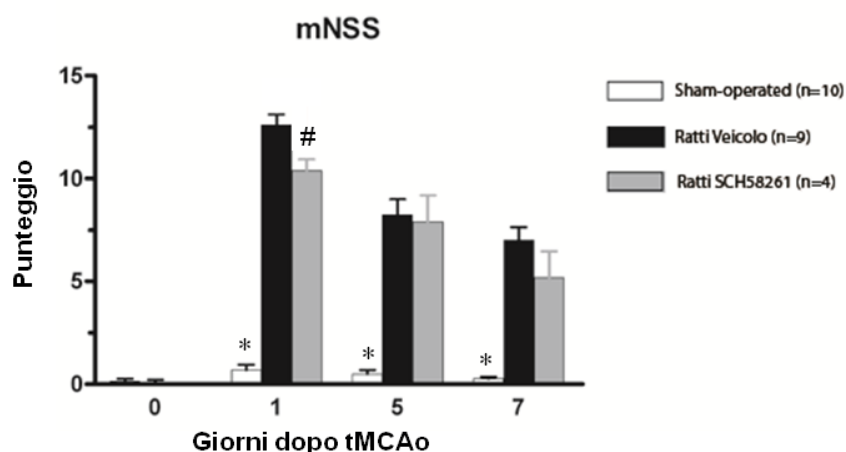


Figura 36. I dati ottenuti con il test mNSS rappresentano la media±E.S. di “n” ratti per gruppo. ANOVA a due vie seguita dal test di comparazione di Bonferroni: * $p < 0.001$ vs ratti ischemici trattati con veicolo e ratti ischemici trattati con SCH58261; # $p < 0.05$ vs ratti ischemici trattati con veicolo

In figura 37 sono riportate le medie dei punteggi ottenuti dagli animali dei vari gruppi sottoposti al test EON prima dell'operazione, un giorno, cinque e sette giorni dopo tMCAo. I ratti sham-operated hanno un punteggio neurologico medio di 17.96 ± 0.03 da uno a sette giorni dopo ischemia transiente. I ratti ischemici trattati con veicolo, un giorno dopo tMCAo hanno uno score neurologico di 8.1 ± 0.5 che recupera spontaneamente a 12.5 ± 0.7 sette giorni dopo tMCAo. In seguito a trattamento cronico con SCH58261 il deficit neurologico valutato con questo test non è modificato rispetto al gruppo di ratti ischemici trattati con veicolo. Il test post hoc di Bonferroni seguente l'analisi della varianza a due vie indica che il deficit neurologico dei ratti sham-operated è statisticamente diverso rispetto sia ai ratti ischemici trattati con veicolo sia ai ratti ischemici trattati cronicamente con SCH58261 ($p < 0.001$).

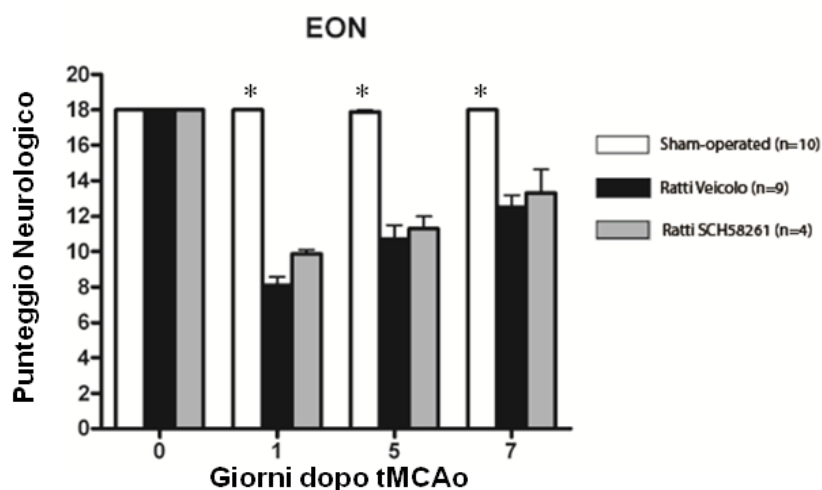


Figura 37. I dati rappresentano la media $\pm$ E.S. di “n” ratti per gruppo. ANOVA a due vie seguita dal test di comparazione di Bonferroni: * $p < 0.001$ vs ratti ischemici trattati con veicolo e ratti ischemici trattati con SCH58261.

3.2 Valutazione della coordinazione motoria e dell'equilibrio mediante rotarod test

La coordinazione motoria e l'equilibrio di ogni ratto di ciascun gruppo sono valutate mediante il test rotarod. In figura 38 è riportato il tempo che gli animali sono riusciti a rimanere sull'asse rotante, fino ad un massimo di 10 minuti, in seguito ad ischemia transiente. I ratti sham-operated rimangono circa 600 sec (tempo massimo) ad ogni time point sull'asse rotante. I ratti ischemici trattati con veicolo erano capaci di stare sull'asse per 77.78 ± 24.65 s, 24 ore dopo tMCAo. Dopo 5 giorni da tMCAo rimanevano sull'asse per 360.62 ± 72.31 s e sette giorni dopo tMCAo erano in gradi di rimanere sull'asse rotante per 366.00 ± 73.09 s. Dopo un giorno dalla tMCAo, il trattamento ripetuto con il farmaco SCH58261 modifica in maniera statisticamente significativa il tempo speso sul rotarod rispetto al gruppo di animali veicolo ($p < 0.01$). Il trattamento ripetuto del farmaco non modifica in maniera statisticamente significativa il tempo speso sul rotarod dagli animali trattati con SCH58261 rispetto al gruppo di animali veicolo cinque e sette giorni dopo tMCAo. Il test post hoc di Bonferroni che segue l'analisi della varianza a due vie indica che il punteggio dei ratti sham-operated è statisticamente diverso rispetto sia ai ratti ischemici trattati con veicolo sia ai ratti ischemici trattati cronicamente con SCH58261 ($p < 0.01$).

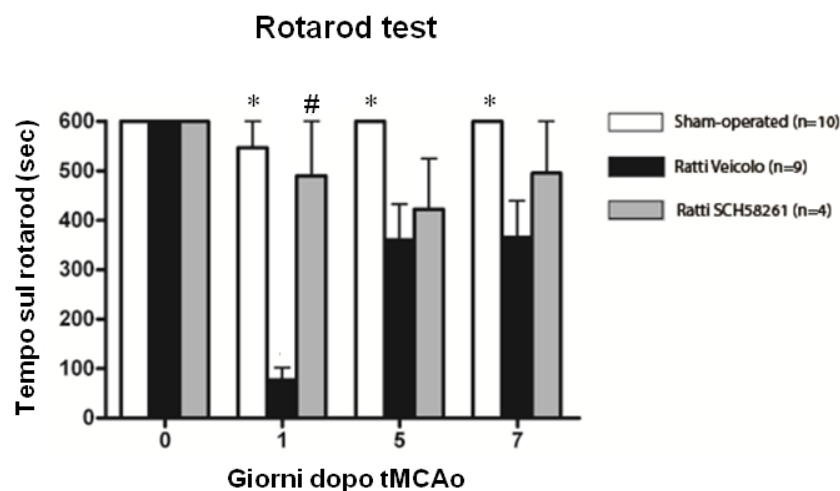


Figura 38. I dati rappresentano la media±E.S. di “n” ratti per gruppo. ANOVA a due vie seguita dal test di comparazione di Bonferroni: * $p<0.01$ vs ratti ischemici trattati con veicolo e ratti ischemici trattati con SCH58261; # $p<0.01$ vs ratti ischemici trattati con veicolo

3.3 Valutazione della perdita di peso corporeo in seguito a tMCAo

Ogni ratto è pesato prima dell’operazione e dopo un giorno, cinque e sette giorni l’occlusione transiente per valutare la variazione del peso. I ratti utilizzati in questo studio hanno un peso corporeo nel range di 270-290 g prima dell’operazione. I dati ottenuti sono riportati in figura 39. Ventiquattro ore dopo ischemia i ratti sham-operated perdono 1.00 ± 0.97 g ma poi tendono ad incrementare il loro peso come valutato fino a sette giorni dopo tMCAo. I ratti ischemici trattati con veicolo perdono 36.00 ± 1.59 g il primo giorno dopo tMCAo, 62.37 ± 7.89 g il quinto giorno e 60.89 ± 10.99 g il settimo giorno dopo tMCAo. Il trattamento cronico per sette giorni con il farmaco SCH58261 non diminuisce la perdita di peso rispetto al gruppo di animali veicolo. Il test post hoc di Bonferroni seguente l’analisi della varianza a due vie indica che il punteggio neurologico dei ratti sham-operated è statisticamente diverso rispetto sia ai ratti ischemici trattati con veicolo sia ai ratti ischemici trattati cronicamente con SCH58261 ($p<0.001$).

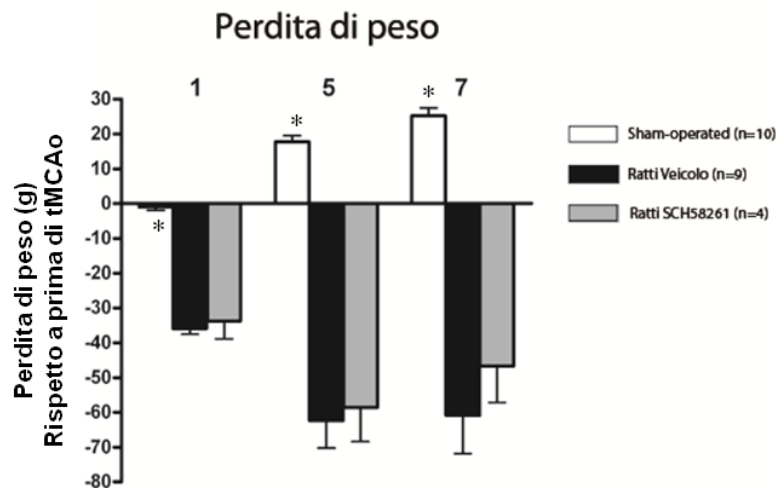
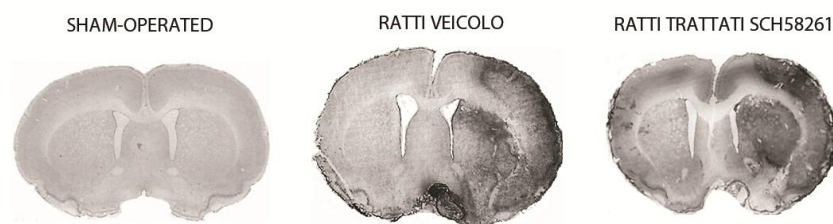


Figura 39. Valutazione della perdita di peso nei tre gruppi di ratti in seguito a tMCAo. I dati rappresentano la media $\pm$ E.S. di “n” ratti per gruppo. ANOVA a due vie seguita dal test di comparazione di Bonferroni: * $p < 0.001$ vs ratti ischemici trattati con veicolo e ratti ischemici trattati con SCH58261.

3.4 Valutazione istologica in seguito a tMCAo

Sette giorni dopo tMCAo i ratti sono stati sacrificati ed è stato valutato il volume di danno presente nelle regioni interessate dall'ischemia cerebrale mediante colorazione istologica. In figura 40 sono riportati esempi di fettine cerebrali dopo colorazione con cresyl violetto per ciascun gruppo di ratti. La colorazione più scura è attribuibile alla elevata concentrazione di nuclei appartenenti alle cellule cerebrali residenti che proliferano tra cui cellule gliali, neuroni residui e cellule che hanno infiltrato le aree ischemiche, corteccia e striato (Fig. 40). Dopo colorazione con cresyl violetto nei ratti ischemici trattati con veicolo, il volume del danno corticale è $75,15 \pm 5,13 \text{ mm}^3$ ed il volume del danno striatale è $28,43 \pm 2,21 \text{ mm}^3$ (Tabella in Fig. 40). La somministrazione cronica di SCH58261 riduce il danno in corteccia ($61,78 \pm 3,22 \text{ mm}^3$) di circa il 16% ma questa riduzione non risulta essere statisticamente significativa. Nei ratti sham-operated non è stato trovato danno ischemico.



RATTI sacrificati 7 giorni dopo tMCAo (1h)	Emisfero controlaterale (mm ³)	Emisfero ipsilaterale (mm ³)	Danno Corticale (mm ³)	Danno Striatale (mm ³)
Sham-operated (n= 10)	285,04±8,62	284,75±8,65	0	0
Ratti VEICOLO (n= 8)	269,88±9,32	289,03±11,05	75,15±5,13	28,43±2,21
Ratti trattati SCH58261 (n= 4)	265,83±4,32	285,26±6,68	61,78±3,22	26,68±2,98

Figura 40. Esempi rappresentativi di fettine cerebrali dopo colorazione istologica con cresyl violetto (1%) per ogni gruppo di ratti. L'emisfero ischemico è intensamente colorato e l'area ischemica ben definita. Il volume dell'emisfero contro laterale ed ipsilaterale (mm³) ed il volume del danno ischemico in corteccia e striato (mm³) sono riportati in tabella come la media±E.S. di "n" ratti per gruppo.

La colorazione con ematossilina/eosina mostra anche che nel parenchima della corteccia e dello striato sono presenti numerosi piccoli nuclei eterocromatici (Fig. 41) con una distribuzione simile a quella osservata nella colorazione con cresyl violetto. La citoarchitettura valutata in ciascun gruppo di ratti mediante colorazione con ematossilina/eosina ha evidenziato che nei ratti ischemici trattati con veicolo, la tMCAo ha causato una consistente diminuzione nell'intensità di colorazione nel tessuto sia a livello dello striato (Fig. 41C) che a livello della corteccia fronto-parietale (Fig. 41D) rispetto ai ratti sham-operated (Fig. 41A e B). Il pallore è dovuto ad un aumento del fluido extracellulare e ad un aumento degli spazi interstiziali conseguente all'edema. Inoltre, una intensa infiltrazione cellulare, soprattutto leucociti, è apprezzabile in entrambe le aree cerebrali. Queste condizioni sono la causa della perdita della tipica citoarchitettura dello striato e della corteccia che si osserva nei ratti ischemici trattati con veicolo (Fig. 41C e D). Il trattamento cronico con SCH58261 è associato ad un pallore della colorazione dovuto ad un incremento dei fluidi extracellulari in striato e corteccia (Fig. 41E e F), la citoarchitettura è parzialmente mantenuta ma è tuttavia presente una alta densità di cellule con nuclei piccoli ed eterocromatici.

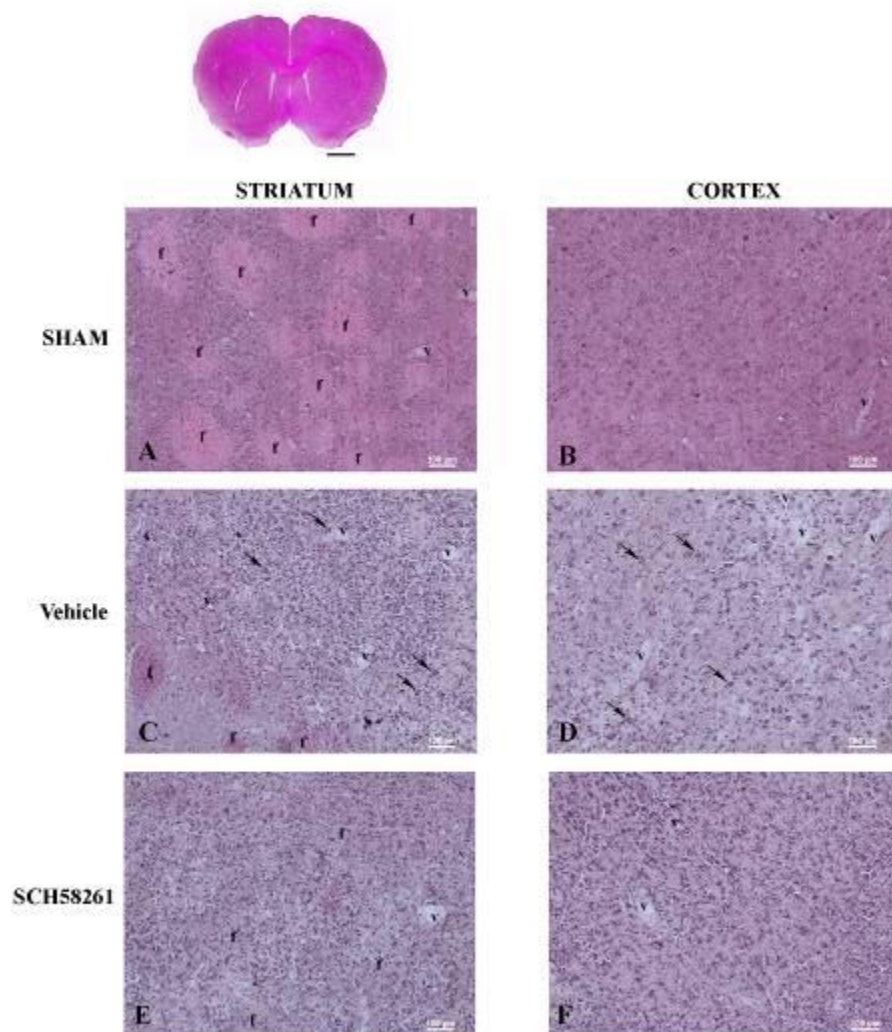


Figura 41. In alto: immagine rappresentativa di una sezione di un cervello di controllo di un ratto colorata con ematossilina/eosina. Scala della barra=2mm.

A-B: Ratti sham-operated. **A:** striato dorsale. La tipica cito-architettura del caudate-putamen è ben apprezzabile: numerosi *fascicula* (f) di sostanza bianca sono circondati da sostanza grigia contenente diversi tipi di neuroni distinti in base alla loro dimensione (Danner e Pfister, 1981).

B: corteccia fronto-parietale. E' apprezzabile la tipica organizzazione colonnare della corteccia. **C-D:** ratti ischemici trattati con veicolo. Notare il pallore del tessuto per l'eccesso di liquido interstiziale. La presenza di diverse cellule polimorfonucleate (frecce) e l'intesa infiltrazione cellulare.

C: Striato dorsale ischemico. La citoarchitettura è completamente persa in gran parte della sezione. La distinzione tra sostanza bianca e grigia non è più apprezzabile, ci sono numerosi vasi dilatati (v) e un aumento consistente degli spazi interstiziali. **D:**

Corteccia fronto-parietale ischemica. L'organizzazione colonnare della corteccia è appena visibile, gli spazi interstiziali sono ingranditi e i vasi sono numerosi e dilatati. **E-F:** Ratti ischemici trattati con SCH58261. **E:** Striato dorsale ischemico. La citoarchitettura è

parzialmente persa a causa della elevata presenza di cellule con nuclei piccoli ed eterocromatici. Pochi fascicoli (f) difficilmente identificabili. **F:** Corteccia fronto-parietale ischemica. L'organizzazione colonnare è parzialmente visibile. Gli spazi interstiziali sono

dilatati. Scala della barra = 100 µm.

Discussione

1. Il dipiridamolo migliora la memoria spaziale in un modello di occlusione delle arterie carotidi comuni (2VO)

Nel modello di ipoperfusione cronica, indotta mediante occlusione bilaterale permanente delle arterie carotidi comuni (2VO), il dipiridamolo è stato somministrato per via endovenosa ad una dose di 4 mg/kg/giorno per una settimana. Sulla base di precedenti valutazioni della sua concentrazione plasmatica *in vivo* nel ratto (Newell et al., 1986) è stato stimato che una tale somministrazione permette di avere una concentrazione plasmatica, per l'intera settimana, di 2-2.5 μ M. Newell e colleghi hanno inoltre valutato letale una dose endovenosa di dipiridamolo pari a 200 mg/kg. La dose di farmaco somministrata agli animali durante questo studio è simile a quella (0.5-3 mg/kg per endovena) utilizzata da Jones e collaboratori (1994). A tale range di concentrazione il dipiridamolo determina un aumento dose-dipendente, durante il tempo di infusione, della velocità del flusso sanguigno coronarico. Gli studi di Hung et al. (2001) hanno inoltre dimostrato che, se somministrato ad una dose pari a 1.4 mg/kg/giorno per una settimana, il farmaco riduce, nel ratto, la fibrosi peritoneale. Tali osservazioni dimostrano che le dosi di dipiridamolo da noi somministrate sono attive in quanto modificano parametri funzionali ed istopatologici.

Nei ratti 2VO un significativo deficit neurologico, valutato con una batteria di sei test sensori-motori (Garcia et al., 1995), è presente 2 e 3 mesi dopo ipoperfusione. E' noto che i piccoli animali sono in grado di recuperare dal deficit neurologico più facilmente rispetto all'uomo, anche entro ore o giorni dopo ischemia. Dopo ischemia transiente indotta mediante occlusione dell'arteria cerebrale media, gli animali tendono a recuperare le loro funzioni sensori-motorie in una settimana (Garcia et al., 1995; Pedata et al. 2005). Al contrario, in questo modello di ipoperfusione le funzioni sensori-motorie tendono a peggiorare nel tempo fino ad un deterioramento significativo 2 e 3 mesi dopo 2VO. Questo dimostra un lento deterioramento delle funzioni sensori-motorie in seguito ad ipoperfusione. Il trattamento con dipiridamolo non migliora il deficit neurologico.

Tre mesi dopo l'occlusione bilaterale delle arterie carotidi comuni, l'analisi istologica dimostra positività delle fettine di tessuto alla colorazione cresyl violetto indicando la mancanza di una significativa morte neuronale. Tali risultati sono in accordo con la

manca di un significativo danno neuronale riportato da Sarti e collaboratori (2002) con la colorazione ematossilina-eosina, tre mesi dopo l'occlusione. Un danno neuronale a livello dell'ippocampo (modesto e non in tutti gli animali) è stato trovato anche una-due settimane dopo un'occlusione sia permanente che transiente delle arterie carotidi comuni rispettivamente con il cresyl violetto (Kim et al., 2006; Annahazi et al., 2007) e con il Tunel (Xu et al., 2008; Tomimoto et al., 2003). Una modesta ma significativa perdita cellulare è stata riportata, grazie alla colorazione ematossilina-eosina, nell'ippocampo, da due a sei mesi dopo un'occlusione permanente delle arterie carotidi comuni (Pappas et al., 1996; Ritchie et al., 2004).

Occorre comunque considerare che il modello di occlusione delle due arterie carotidi comuni separatamente ad un intervallo di una settimana, come utilizzato da Sarti et al. (2002) e nei nostri esperimenti, consente di sviluppare una ipoperfusione in modo più graduale seguita da una minore morte neuronale. In accordo, modelli di ischemia cronica nel ratto, hanno mostrato che i neuroni sono in grado di resistere in uno stato prolungato di ipometabolismo quando i substrati energetici sono scarsi (Odano et al., 1995).

Due e tre mesi dopo 2VO i ratti mostrano un significativo deficit nella memoria di lavoro spaziale come mostra la diminuzione di alternanza valutata mediante Y Maze test, mentre la memoria di lavoro non spaziale valutata mediante Object recognition test non subisce modificazioni significative. La compromissione di comportamenti complessi può riflettere alterazioni a livello subcellulare, sinaptico o elettrofisiologico, o anche diffuse alterazioni morfologiche che non possono essere quantificate mediante valutazione istologica (Aronowski et al., 1996), come trovato nei nostri esperimenti. Una riduzione nel metabolismo cerebrale è sufficiente ad indurre un peggioramento della memoria di lavoro (Plaschke et al., 1999).

Il dipiridamolo, somministrato per una settimana attraverso la vena giugulare, ripristina significativamente la memoria spaziale valutata mediante l'alternanza nell'Y maze test a valori simili a quelli valutati nei ratti sham-operated 3 mesi dopo 2VO. A questo riguardo è interessante che Weinstock e Shoham (2004) hanno dimostrato che è possibile salvare i neuroni dell'ippocampo e prevenire deficit della memoria spaziale se i vasi sono de-occlusi una o due settimane dopo.

Quindi il dipiridamolo è capace di migliorare le performance cognitive senza migliorare le funzioni sensori-motorie. Studi di neuroprotezione in modelli animali di ischemia hanno riportato scarsa correlazione tra protezione istologica e protezione funzionale (Brdon et al., 2007; Durukan et al., 2007). Per esempio, nonostante l'assenza di una chiara evidenza patologica di miglioramento delle dimensioni dell'infarto, le valutazioni comportamentali possono rivelare l'efficacia di un farmaco neuroprotettivo (Yamaguchi et al, 1995; Kawamata et al, 1996). La mancanza di correlazione tra misure di outcome diversi indica che sia gli endpoint comportamentali, neurologici che istologici sono tutti necessari per una comprensione efficace e globale dell'effetto protettivo di un farmaco in modelli di stroke come anche in modelli di ipoperfusione cronica cerebrale. Quindi l'associazione di appropriati test comportamentali con valutazioni istologiche è essenziale per la valutazione dell'effetto protettivo farmacologico dall'ischemia (Durukan e Tatlisumak, 2007; Roof et al, 2001).

Recenti evidenze hanno mostrato nuove proprietà del dipiridamolo come la riduzione della produzione di citochine pro-infiammatorie (TNF α , IL-8) (Al-Bahrani et al., 2007) e il rilascio di chemochine (MCP-1) (Weyrich et al., 2005). Inibendo p38 MAPK che riduce la traslocazione nucleare di NF- κ B, il dipiridamolo inibisce l'espressione della metalloproteasi di matrice-9 (MMP-9) (Weyrich et al., 2005) e della COX-2 nei macrofagi (Chen et al., 2006). Il dipiridamolo ha effetti anti-infiammatori inibendo anche l'espressione di geni critici nell'infiammazione come MCP-1 e MMP-9 (Weyrich et al., 2005). Recenti studi indicano che la proteina chemoattrattiva dei monociti 1 (MCP-1) è essenziale per il reclutamento delle cellule del sangue nel sito del danno dopo ischemia cerebrale mentre la sua carenza non influisce sulla attivazione e migrazione della microglia residente (Schilling et al., 2009). Dopo ischemia cerebrale, la microglia è rapidamente attivata mentre l'infiltrazione dei macrofagi è un evento più tardivo. I topi knock out per MCP-1 mostrano un volume dell'infarto cerebrale più attenuato dopo ischemia focale transiente (Hughes et al., 2002). Un diverso profilo nell'espressione di chemochine e/o citochine in seguito alla inibizione dell'espressione di MCP-1 potrebbe essere responsabile della protezione.

E' possibile che il miglioramento della memoria spaziale osservato nei nostri esperimenti 3 mesi dopo 2VO sia da attribuire ad effetti anti-infiammatori del dipiridamolo.

Appare interessante valutare in studi futuri se gli effetti protettivi del dipiridamolo su parametri cognitivi si associno a una riduzione di parametri infiammatori a livello cerebrale.

2a. In condizioni fisiologiche, *in vivo*, adenosina extracellulare non deriva dall'idrolisi di ATP ma è rilasciata come tale dalle cellule

Le concentrazioni extracellulari di adenosina in condizioni normossiche risultano essere nel range di 130-140 nM. Dato che l'affinità dei recettori A_1 e A_{2A} è calcolata nel range nM, alle concentrazioni raggiunte extracellularmente in condizioni normossiche, i recettori A_1 e A_{2A} ad alta affinità possono essere stimolati (Latini e Pedata, 2001).

Le concentrazioni extracellulari di ATP, in condizioni fisiologiche, sono nel range di 30-45 nM.

Nello studio è stato utilizzato POM-4, inibitore selettivo delle NTPDasi 1, 2 e 3, che è considerato uno degli strumenti più utili ed il migliore disponibile attualmente, per l'inibizione del catabolismo dell'ATP extracellulare (Muller et al., 2006). Quando le ecto-ATPasi sono inibite, le concentrazioni di ATP raggiungono livelli intorno a 360 nM. I recettori P2 per ATP, possono essere stimolati a concentrazioni tra nM e μ M (Burnstock, 2007). Dunque concentrazioni intorno a 360 nM possono interagire con i recettori P2, prima della degradazione dell'ATP ad adenosina, e sono compatibili con il ruolo giocato dall'ATP extracellulare nel cervello in condizioni normossiche.

In presenza di POM-4, le concentrazioni di ATP extracellulare sono aumentate di circa 9 volte; le concentrazioni di adenosina in conseguenza alla somministrazione del farmaco non sono invece alterate. Quest'ultima osservazione dimostra che l'adenosina, in condizioni basali, è rilasciata di *per se* dalla cellula e non deriva dall'idrolisi di ATP extracellulare, in quanto la variazione di quest'ultima non influenza la concentrazione di adenosina rilasciata. Questo risultato è in accordo con

un lavoro precedente, in cui è stato dimostrato come durante l'inibizione dell'idrolisi dell'AMP da parte di AOPCP, l'adenosina rilasciata a seguito di vari stimoli, non risulti influenzata (Daval e Barberis 1981; Hoehn e White 1990; Sweeney 1996; Lloyd et al. 1993; Pedata et al. 1983, 1993).

Dopo l'inibizione delle ecto-nucleotidasi (grazie all'utilizzo del POM-4), le concentrazioni di ATP arrivano a circa 360 nM, mentre in assenza dell'inibitore l'ATP è intorno a 30-45 nM; quindi circa 315-330 nM di ATP vengono idrolizzate dalle ecto-nucleotidasi. Questa idrolisi non porta però alterazioni nelle concentrazioni di adenosina. E' verosimile che in condizioni basali, quando le concentrazioni di ATP sono stimate nel basso range nM, come nel presente studio, le ecto-5'-nucleotidasi non siano efficaci nell'idrolizzare AMP in quanto la K_m della ecto-5'-nucleotidasi è riportata nel range μM (Zimmermann, 1992). Questo insieme alla scarsa localizzazione neuronale delle ecto-5'-nucleotidasi (rispetto a quella gliale) (Zimmermann, 1992) può spiegare la mancata formazione di adenosina. Ciò significa che circa il 90% di ATP idrolizzata rimane sotto forma dei prodotti intermedi ADP e AMP, che non vengono convertiti in adenosina.

2b. Modalità di rilascio di adenosina in condizioni fisiologiche

Grazie all'utilizzo dell'immunoistochimica e della microscopia elettronica, è stata dimostrata la presenza del trasportatore concentrativo dei nucleosidi CNT2 sulla membrana delle terminazioni sinaptiche, sulla membrana delle vescicole sinaptiche, nonché nell'apparato del Golgi, nello striato di ratto. La presenza di CNT2 sui neuroni è in accordo con precedenti osservazioni su sezioni di tessuto di cervello di ratto (Guillen-Gomez et al., 2004). L'mRNA del trasportatore CNT2 è stato individuato nel cervello di ratto, compreso lo striato (Anderson et al., 1996; Guillen-Gomez et al., 2004). La presenza di questo trasportatore su vescicole sinaptiche suggerisce che adenosina intracellulare, formata da AMP, venga immagazzinata all'interno di vescicole e rilasciata in condizioni fisiologiche, in seguito alla attività elettrica con meccanismo di eccitazione-secrezione Ca^{2+} -dipendente, tipico delle cellule nervose. A conferma di quanto dimostrato, la spontanea fuoriuscita di adenosina, che è stata valutata *in vivo* in condizioni fisiologiche nel microdialisato dello striato (Pazzagli et

al. 1993) e del talamo (Dobolyi et al. 2000) è inibita del 50% da TTX. Nostri esperimenti dimostrano inoltre come la liberazione di adenosina in condizioni normossiche *in vivo* sia Ca^{2+} dipendente (rilascio di adenosina in condizioni basali 183.2 ± 16.7 nM, n=4; in assenza di Ca^{2+} la concentrazione di adenosina è ridotta del 41% a 107.9 ± 24.6 nM, n=4) .

Recenti dati dimostrano che il rilascio di adenosina dopo stimolazioni fisiologiche brevi e ad alta frequenza è indipendente dall'attività del trasportatore o dal metabolismo di ATP (Pajski and Venton, 2010) e suggeriscono un rilascio dinamico per adenosina simile ad una esocitosi vescicolare in un modello, *in vitro*, di fettine di cervelletto (Klyuch et al., 2011).

A supporto di un rilascio esocitotico di adenosina, è anche l'osservazione che la concentrazione di adenosina, misurata in condizioni fisiologiche *in vivo*, non è inibita ma bensì incrementata significativamente dal dipiridamolo, inibitore dei trasportatori equilibrativi dei nucleosidi. Tali trasportatori (ENT) operano secondo il gradiente di concentrazione trasportando sia dentro che fuori la cellula adenosina, dunque la loro inibizione può portare sia ad un aumento che ad una diminuzione della concentrazione di adenosina extracellulare (Phillis et al. 1989). Nel cervello dei ratti il dipiridamolo inibisce sia gli ENT1 che gli ENT2 (Thorn e Jarvis 1996). In precedenti lavori *in vivo*, è stato dimostrato che il dipiridamolo centralmente somministrato in condizioni fisiologiche, aumenta il rilascio di adenosina dallo striato (Ballarin 1991; Pazzagli 1993) indicando che il carrier è facilitante l'influsso piuttosto che l'efflusso di adenosina.

Inoltre abbiamo considerato la possibilità che se in presenza di POM-4 avessimo avuto una riduzione di adenosina (che avrebbe indicato un'origine dall'idrolisi di ATP extracellulare) tale da creare un gradiente di membrana favorente l'efflusso di adenosina tramite il trasportatore, questo avrebbe potuto mascherare la riduzione di adenosina. In definitiva l'osservazione che il dipiridamolo aumenta la concentrazione di adenosina extracellulare esclude la possibilità che l'adenosina sia trasportata fuori dalle cellule tramite i trasportatori equilibrativi (ENTs).

2c. In condizioni ischemiche, *in vivo*, adenosina deriva dall'idrolisi di ATP

I risultati ottenuti in presenza dell'inibitore selettivo delle ecto-ATPasi di membrana, POM-4, mostrano che durante i 240 minuti successivi alla MCAo, le concentrazioni extracellulari di ATP aumentano da circa 50 nM (nei ratti non trattati con il farmaco) a circa 450 nM (nei ratti trattati con POM-4), mentre per adenosina si riducono da circa 690 nM a 275 nM. Questo risultato indica che nelle prime ore di ischemia (4 ore) la quantità di adenosina generata dalla degradazione di ATP extracellulare sia uguale alla differenza tra i valori ottenuti senza e con farmaco, cioè almeno 400 nM (il 60%), mentre la frazione derivante solo ed esclusivamente dalle cellule sia pari a quella rilevata nei ratti trattati con POM-4 (275 nM cioè il 40%). È interessante notare come la somma delle concentrazioni di ATP e adenosina nei ratti veicolo (circa 740 nM), sia molto simile a quella registrata nei ratti trattati con POM-4 (circa 725 nM), questo indica che tutto l'ATP che viene degradato dalle ecto-nucleotidasi si trasforma in adenosina, senza rimanere nei metaboliti intermedi ADP o AMP. Da notare inoltre che nei ratti veicolo la concentrazione di adenosina totale (690 nM) rappresenta ben il 90% di questa somma, dimostrando che ATP è efficacemente degradato ad adenosina nelle 4 ore dopo ischemia. Quindi oltre ad essere rilasciata dalle cellule, i risultati mostrano che dopo ischemia adenosina è per la maggior parte prodotta da ATP extracellulare.

Osservando le variazioni di concentrazione di adenosina, si nota che nei ratti veicolo dopo MCAo si ha un marcato e rapido incremento di adenosina, mentre ATP aumenta più lentamente. Eseguendo un'accurata analisi, in base al tempo, del rapporto tra adenosina di origine extracellulare (prodotta dalla idrolisi di ATP) e adenosina di origine intracellulare (liberata "per sé" dalla cellula), risulta che nei primi 20 minuti dopo MCAo, è la degradazione di ATP a determinare il forte incremento di adenosina, successivamente invece la quantità di adenosina che deriva dalla cellula è paragonabile alla quantità di adenosina che deriva da ATP extracellulare.

L'efficiente produzione di adenosina a partire da ATP nelle prime ore dopo MCAo può essere dovuta al fatto che le ecto-nucleotidasi subiscono una rapida "up-regolazione" come dimostrato da analisi immunocitochimiche: le ecto-nucleotidasi sono associate alla membrana plasmatica di astrociti, oligodendrociti e cellule

microgliali (Shoen et al., 1987; Grondal et al., 1988) ed è stata descritta una loro “up-regolazione” sugli astrociti reattivi localizzati nel tessuto circostante l’infarto dopo 6 ore da MCAo (Braun, 1997) e nei giorni seguenti (de Paula Cognato et al., 2005).

Nonostante ATP sia un importante metabolita cellulare, durante ischemia ATP viene così liberato dalle cellule. Tale osservazione è in accordo con quanto osservato in precedenti studi (Melani et al., 2005) e ATP viene convertito efficacemente ad adenosina specie nei primi 20 minuti dopo ischemia. Certamente ATP liberato prima della degradazione ad adenosina è in concentrazioni tali (320-450 nM) da poter agire sui suoi recettori. In particolare ATP agendo sui recettori P2X₇ espressi de novo (Melani et al., 2006) produce effetti nocicettivi e un’eccessiva depolarizzazione cellulare che aggrava il danno ischemico, come dimostrato dalla neuroprotezione prodotta dagli antagonisti dei recettori P2 (Melani et al., 2006; Lammer et al., 2006).

Una efficace degradazione di ATP in condizioni ischemiche può rendere conto di due effetti sinergici volti a limitare il danno neuronale: produzione di adenosina, molecola ad azione neuroprotettiva, e rimozione di ogni possibile effetto citotossico mediato da ATP su neuroni e oligodendrociti (Edwards, 1996; Amadio et al., 2002; Domercq et al., 2010).

Considerando il ruolo di adenosina ed ATP in condizioni ischemiche, stabilire il contributo di ATP extracellulare alla formazione di adenosina risulta importante nella prospettiva di una possibile strategia purinergica volta alla protezione dal danno ischemico. A questo riguardo gli enzimi apirasi si sono dimostrati efficaci nella protezione dal danno ischemico cerebrale (Marcus et al., 2005). Il loro meccanismo protettivo può quindi essere attribuito vuoi alla rimozione di effetti citotossici mediati da ATP che ad un aumento di adenosina extracellulare che agendo su recettori A₁ svolge un ruolo neuroprotettivo riducendo l’attività neuronale e il consumo energetico (Pedata et al., 2007).

3. Somministrazione cronica di SCH58261, antagonista selettivo dei recettori A_{2A} di adenosina, in un modello *in vivo* di tMCAo

In paragone alla ischemia focale permanente, il modello più blando di ischemia focale transiente indotto mediante MCAo di una ora consente una buona sopravvivenza dei ratti fino a mesi dopo ischemia. Questo modello consente di testare se un trattamento farmacologico è protettivo a tempi più lunghi dopo ischemia. Utilizzando tale modello abbiamo dimostrato che il trattamento con l'antagonista selettivo dei recettori A_{2A} adenosinici, SCH58261, somministrato cronicamente via intraperitoneo alla dose di 0,01 mg/kg, non induce al termine dei 7 giorni alcun miglioramento significativo rispetto al gruppo di animali di controllo.

La valutazione del deficit neurologico e motorio mediante il test mNSS mostra un miglioramento significativo nei ratti trattati con il farmaco rispetto ai ratti trattati con veicolo solo 1 giorno dopo tMCAo. Cinque e sette giorni dopo occlusione non c'è differenza tra il deficit nei ratti trattati con SCH58261 rispetto ai ratti trattati con veicolo. Il trattamento con l'antagonista selettivo dei recettori A_{2A} per adenosina non mostra differenze rispetto ai ratti trattati con veicolo nel test sensoriale e motorio effettuato con l'esame EON e neanche per quanto riguarda il recupero del peso corporeo dopo 1, 5 e 7 giorni da tMCAo. Per quanto riguarda la coordinazione motoria e l'equilibrio dei ratti, valutate con il test rotarod, il trattamento con SCH58261 migliora significativamente il tempo speso sopra il rotarod dei ratti trattati con il farmaco rispetto ai ratti veicolo dopo 1 giorno da tMCAo, ma a 5 e 7 giorni non vi è più differenze significativa.

In studi precedenti noi abbiamo dimostrato nel modello di ischemia permanente, che gli antagonisti dei recettori A_{2A} di adenosina sono protettivi 24 ore dopo l'ischemia riducendo il danno cerebrale ischemico, il deficit neurologico (Melani et al., 1999; 2006; Monopoli et al., 1998) e la disorganizzazione della mielina (Melani et al., 2009). Diverse evidenze, incluse le nostre (Melani et al., 2003; Pedata et al., 2012), dimostrano che la protezione degli antagonisti A_{2A} di adenosina dopo ischemia è attribuita ad un precoce controllo di un eccesso di eccitotossicità dovuto a riduzione delle concentrazioni extracellulari di glutammato (Pedata et al., 2001; 2003; 2005; 2007; Marcoli et al., 2003). Adenosina infatti, mediante stimolazione dei recettori A_{2A} ,

riduce l'uptake di glutammato dagli astrociti (Pintor et al., 2004) e, in condizioni ischemiche, promuove il rilascio di glutammato (O'Regan et al., 1992; Simpson et al. 1992) dai neuroni e dalle cellule gliali (Chen e Pedata, 2008). L'aumento delle concentrazioni di aminoacidi eccitatori è un evento precoce che dopo ischemia attiva una cascata eccitotossica che risulta in una acuta e ritardata morte cellulare (Bruce-Keller, 1999). Dopo ischemia un iniziale massivo incremento di glutammato è seguito dalla attivazione delle cellule immuni residenti, i.e. la microglia, e dalla produzione o attivazione di mediatori infiammatori (Dirnagl et al., 1999). Citochine pro infiammatorie, che upregolano le molecole di adesione cellulare, probabilmente esercitano un importante ruolo nel promuovere l'accumulo di neutrofili (Stoll et al., 1998; Huang et al., 2006). Seppur dopo ischemia l'attivazione precoce di cellule immunitarie può essere neuro protettiva e di supporto per la rigenerazione, una protatta neuroinfiammazione è ora riconosciuta come il meccanismo predominante della progressione secondaria del danno cerebrale. Nel nostro modello, sette giorni dopo ischemia transiente, l'analisi istologica del tessuto ischemico di corteccia e striato mostra la presenza di molte cellule infiltrate derivate dal midollo osseo. Una definita attivazione microgliale è stata descritta dodici ore dopo tMCAo, quindi infiltrano i macrofagi (Gelderblom et al., 2009). L'infiltrazione è massima dopo 3 giorni quando la maggior parte delle cellule immunitarie sono neutrofili e meno linfociti (Gelderblom et al., 2009). L'accumulo dei neutrofili è correlato alla severità del danno del tessuto cerebrale ed allo scarso recupero neurologico (Akopov et al., 1996).

I nostri studi dimostrano che l'infiltrazione è ben detettabile fino a sette giorni dopo tMCAo e che l'antagonista A_{2A} non protegge dall'infiltrazione.

Quindi l'antagonista A_{2A} SCH58261, somministrato cronicamente seppur protegge dal deficit neurologico e motorio 24 ore dopo ischemia transiente, non è più protettivo a tempi più lunghi (i.e. 7 giorni dopo tMCAo). E' presumibile che il non mantenimento di protezione da parte dell'antagonista, come valutato dopo sette giorni dall'ischemia, sia dovuto alla non protezione dal danno secondario dovuto alla infiltrazione ed infiammazione cerebrale.

I risultati di questi esperimenti supportano che gli antagonisti A_{2A} proteggano da un precoce eccesso di eccitotossicità ma che la protezione non sia mantenuta quando

eventi più tardivi infiammatori giocano un ruolo preminente nella progressione del danno ischemico.

Nel nostro laboratorio esperimenti preliminari in corso indicano che ore e giorni dopo ischemia, agonisti sui recettori A_{2A} adenosinici sono protettivi dall'infiltrazione e dal danno ischemico probabilmente agendo su A_{2A} recettori presenti sui leucociti. E' infatti noto che agonisti dei recettori A_{2A} adenosinici sui leucociti riducono parametri di adesione e infiammazione (Sullivan, 2003).

Bibliografia

- Abbracchio M.P. and Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.* 64: 445-75; 1994.
- Abbracchio M.P., Brambilla R., Ceruti S., Kim H.O., Von Lubitz D.K., Jacobson K.A. and Cattabeni F. G protein-dependent activation of phospholipase C by adenosine A₃ receptors in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 48, 1038–1045; 1995.
- Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, King BF, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. and Burnstock G. Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y₁₄ receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci.* 24: 52-5; 2003.
- Abraham E.H., Prat A.G., Gerweck L., Seneveratne T., Arceci R.J., Kramer R., Guidotti G. and Cantiello H.F. The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 312-6; 1993.
- Ahmad S., Ahmad A., McConville G., Schneider B.K., Allen C.B., Manzer R., Mason R.J. and White CW. Lung epithelial cells release ATP during ozone exposure: signaling for cell survival. *Free Radic Biol Med.* 39:213-26; 2005.
- Akopov SE, Simonian NA, Grigorian GS: Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke.* 27:1739-1743, 1996.
- Al-Bahrani, A. et al. TNF- α and IL-8 in acute stroke and the modulation of these cytokines by antiplatelet agents. *Curr Neurovasc Res.* 4: 31-37; 2007.
- Alessandrini A., Namura S., Moskowitz M.A. and Bonventre J.V. MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 12866-12869, 1999.
- Aleu J., Martín-Satué M., Navarro P., Pérez de Lara I., Bahima L., Marsal J. and Solsona C. Release of ATP induced by hypertonic solutions in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 547(Pt 1):209-19; 2003.
- Allan S.M. and Rothwell N.J. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2: 734-744, 2001.
- Almeida T., Rodrigues R.J., de Mendonca A., Ribeiro J.A. and Cunha R.A. Purinergic P2 receptors trigger adenosine release leading to adenosine A_{2A} receptor activation and facilitation of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 122: 111–121, 2003.
- Amadio S., D'Ambrosi N., Cavaliere F., Murra B., Sancesario G., Bernardi G., Burnstock G. and Volontè C. P2 receptor modulation and cytotoxic function in cultured CNS neurons. *Neuropharmacology* 42, 489-501; 2002.
- Anderson C.M., Xiong W., Young J.D., Cass C.E. and Parkinson F.E. Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 42, 358-361; 1996.
- Annahazi A., Mracsko E., Sule Z., Karg E., Penke B., Bari F. and Farkas E. “Pre-treatment and post-treatment with alpha-tocopherol attenuates hippocampal neuronal damage in experimental cerebral hypoperfusion.” *Eur J Pharmacol.* 571 (2-3):120-8. 2007

- Arcuino G, Lin JH, Takano T, Liu C, Jiang L, Gao Q, Kang J, Nedergaard M. Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 9840-5; 2002.
- Aronowski, J., R. Strong and J.C. Grotta. Citicoline for treatment of experimental focal ischemia: histologic and behavioral outcome. *Neurol Res*. 18: 570-574; 1996.
- Aspinwall C.A. and Yeung E.S. Screening populations of individual cells for secretory heterogeneity. *Anal Bioanal Chem*. 381: 660-6; 2005.
- Astrup J., Siesjo B.K. and Symon, L. Thresholds in cerebral ischemia—The ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723–725. 1981.
- Atkinson L., Batten T.F. and Deuchars J. P2X(2) receptor immunoreactivity in the dorsal vagal complex and area postrema of the rat. *Neuroscience*. 99: 683-96; 2000.
- Avruch J, Zhang XF. and Kyriakis JM. Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci*. 19: 279-83; 1994.
- Bailey SJ. and Hourani SM. Effects of suramin on contractions of the guinea-pig vas deferens induced by analogues of adenosine 5'-triphosphate. *Br J Pharmacol*. 114: 1125-32; 1995.
- Ballarín M., Fredholm B.B., Ambrosio S. and Mahy N. Extracellular levels of adenosine and its metabolites in the striatum of awake rats: inhibition of uptake and metabolism. *Acta Physiol Scand*. 142, 97-103; 1991.
- Bankston L.A. and Guidotti G. Characterization of ATP transport into chromaffin granule ghosts. Synergy of ATP and serotonin accumulation in chromaffin granule ghosts. *J Biol Chem*. 271: 17132-8; 1996.
- Baraldi P.G., Cacciari B., Spalluto G., Bergonzoni M., Dionisotti S., Ongini E., Varani K. and Borea PA. Design, synthesis, and biological evaluation of a second generation of pyrazolo[4,3-e]1, 2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidines as potent and selective A_{2A} adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem*. 41, 2126–2133; 1998.
- Barone F.C., Irving E.A., Ray A.M., Lee J.C., Kassis S., Kumar S., Badger A.M., Legos J.J., Erhardt J.A., Ohlstein E.H., Hunter A.J., Harrison D.C., Philpott K., Smith B.R., Adams J.L. and Parsons A.A. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase provides neuroprotection in cerebral focal ischemia, *Med. Res. Rev*. 21: 129–145, 2001.
- Bartolini L., Casamenti F. and Pepeu G. “Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions.” *Pharmacol Biochem Behav*. 53: 277-83. 1996.
- Becker K.J. Inflammation and acute stroke. *Curr Opin Neurol*. 11: 45-49, 1998.
- Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A. and Freeman B.A.. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 87: 1620–1624, 1990.
- Beetsch J.W., Park T.S., Dugan L.L., Shah A.R. and Gidday J.M. Xanthine oxidase-derived superoxide causes reoxygenation injury of ischemic cerebral endothelial cells. *Brain Res*. 786: 89–95, 1998.
- Bennett S.A., Tenniswood M., Chen J.H., Davidson C.M., Keyes M.T., Fortin T., Pappas A. “Chronic cerebral hypoperfusion elicits neuronal apoptosis and behavioural impairment.” *Neuro Report*. 9: 161-166. 1998.
- Bergendorff A. and Uvnäs B. Storage properties of rat mast cell granules in vitro. *Acta Physiol Scand*. 87: 213-22; 1973.

- Berkow R. and Fletcher A.J. Neurological disorders. 1381-1386. 1981.
- Beukers M.W., Chang L.C., von Frijtag Drabbe Künzel J.K., Mulder-Krieger T., Spanjersberg R.F., Brussee J. and IJzerman A.P. New, non-adenosine, high-potency agonists for the human adenosine A2B receptor with an improved selectivity profile compared to the reference agonist N-ethylcarboxamidoadenosine. *J Med Chem.* 47: 3707-3709, 2004.
- Biber K., Laurie D.J., Berthele A., Sommer B., Tölle T.R., Gebicke-Härter P.J., van Calcar D. and Boddeke H.W. Expression and signaling of group I metabotropic glutamate receptors in astrocytes and microglia. *J Neurochem.* 72: 1671-1680, 1999.
- Biederbick A, Rose S, Elsässer HP. A human intracellular apyrase-like protein, LALP70, localizes to lysosomal/autophagic vacuoles. *J Cell Sci.* 112: 2473-2484; 1999.
- Blake A. Dipyrindamole is neuroprotective for cultured rat embryonic cortical neurons. *Biochemical and Biophysical research Communications.* 314: 501-504. 2004.
- Blass K.E., Block H.U., Forster W., Ponicke K. Dipyrindamole: a potent stimulator of prostacyclin (PGI₂) biosynthesis. *Br J Pharmacol.* 68:71-73. 1980.
- Bo X., Fischer B., Maillard M., Jacobson KA. and Burnstock G. Comparative studies on the affinities of ATP derivatives for P2x-purinoceptors in rat urinary bladder. *Br J Pharmacol.* 112: 1151-9; 1994.
- Bodin P, Burnstock G. ATP-stimulated release of ATP by human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 27: 872-5; 1996.
- Boehm S. and Kubista H. Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacol Rev.* 54(1): 43-99; 2002.
- Born G.V.R. and Cross M.J. Inhibition of the aggregation of blood platelets by substances related to adenosine diphosphate. *J Physiol.* 166:29P-30P. 1963.
- Borsello T., Clarke PG., Hirt L., Vercelli A., Repici M., Schorderet DF., Bogousslavsky J. And Bonny C. A peptide inhibitor of c-jun N-terminal protects against excitotoxicity and cerebral ischemia. *Nat Med* 9: 1180-1186; 2003
- Boué-Grabot E, Archambault V, Séguéla P. A protein kinase C site highly conserved in P2X subunits controls the desensitization kinetics of P2X(2) ATP-gated channels. *J Biol Chem.* 275: 10190-5; 2000.
- Bowes M.P., Rothlein R., Fagan S.C. and Zivin JA. Monoclonal antibodies preventing leukocyte activation reduce experimental neurologic injury and enhance efficacy of thrombolytic therapy. *Neurology* 45: 815-819, 1995.
- Boyer JL, Delaney SM, Villanueva D. and Harden TK. A molecularly identified P2Y receptor simultaneously activates phospholipase C and inhibits adenylyl cyclase and is nonselectively activated by all nucleoside triphosphates. *Mol Pharmacol.* 57: 805-10; 2000.
- Boyer JL, Zohn IE, Jacobson KA. and Harden TK. Differential effects of P2-purinoceptor antagonists on phospholipase C- and adenylyl cyclase-coupled P2Y-purinoceptors. *Br J Pharmacol.* 113: 614-20; 1994.
- Braun N., Lenz C., Gillardon F., Zimmermann M. and Zimmermann H. Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase. *Brain Res.* 766, 213-226; 1997.
- Brdon J., Kaiser S., Hagemann F., Zhao Y., Culman J., Gohlke P. Comparison between early and delayed systemic treatment with candesartan of rats after ischaemic stroke. *J Hypertens.* 25: 187-196. 2007

- Bridges A.J., Bruns R.F., Ortwine D.F., Priebe S.R., Szotek D.L. and Trivedi B.K. N6-[2-(3,5-dimethoxyphenyl)-2-(2-methylphenyl)ethyl]adenosine and its uronamide derivatives. Novel adenosine agonists with both high affinity and high selectivity for the adenosine A2 receptor. *J Med Chem.* 31: 1282-1285, 1988.
- Brint S., Jacewicz M., Kiessling M., Tanabe J., Pulsinelli W. Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 8 (4): 474-485. 1988.
- Brown S. J., James S., Reddington M., and Richardson P. J. Both A1 and A2a purine receptors regulate striatal acetylcholine release. 55: 31-38; 1990.
- Bruce-Keller A.J. Microglial-neuronal interactions in synaptic damage and recovery. *J. Neurosci. Res.* 58: 191-201, 1999.
- Bruns, R. F., Fergus, J. H., Badger, E. W., Bristol, J. A., Santay, L. A., Hartman, J. D., Hays, S. J., and Huang, C. C. Binding of the A1-selective adenosine antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine to rat brain membranes. 335: 59-63; 1987.
- Brunschweiler A. and Müller C.E. P2 receptors activated by uracil nucleotides--an update. *Curr Med Chem.* 13: 289-312; 2006.
- Budd S.L. Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. *Pharmacol Ther.* 80: 203-229; 1998.
- Bunag R.D., Douglas C.R., Imai S. and Berne R.M. Influence of a pyrimidopyrimidine derivative on deamination of adenosine by blood. *Circ Res.* 15:83-88. 1964.
- Burnstock G. 2007. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87, 659-797.
- Burnstock G. and Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol.* 16: 433-40; 1985.
- Burnstock G. and Williams M. P2 purinergic receptors: modulation of cell function and therapeutic potential. *J Pharmacol Exp Ther.* 295: 862-869; 2000.
- Burnstock G. Purine nucleotides. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 15: 225-35; 1976.
- Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 24: 509-81; 1972.
- Burnstock G., Cocks T., Crowe R. and Kasakov L. Purinergic innervation of the guinea-pig urinary bladder. *Br J Pharmacol.* 63: 125-38; 1978.
- Calabresi P., Centonze D., Pisani A. and Bernardi G. Endogenous adenosine mediates the presynaptic inhibition induced by aglycemia at corticostriatal synapses. 17: 4509-4516; 1997.
- Camara S., de la Cruz J.P., Frutos M.A., et al. Effects of dipyridamole on the short-term evolution of glomerulonephritis. *Nephron.* 58:13-16. 1991.
- Cao J., Viholainen J.I., Dart C., Warwick H.K., Leyland M.L. and Courtney M.J. The PSD95-nNOS interface: a target for inhibition of excitotoxic p38 stress-activated protein kinase activation and cell death. *J. Cell Biol.* 168: 117-126, 2005.
- Castellanos M., Leira R., Serena J., et al. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke.* 34:40-6. 2003.
- Chakrabarti S., et al. The effect of dipyridamole on vascular cell-derived reactive oxygen species. *J Pharmacol Exp Ther.* 315: 494-500. 2005.

- Chan P.H. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21: 2–14, 2001.
- Chen C.C., Akopian A.N., Sivilotti L., Colquhoun D., Burnstock G. and Wood JN. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature.* 377: 428-31; 1995.
- Chen J., Sanberg P.R., Li Y., Wang L., Lu M., Willing A.E., Sanchez-Ramos J. and Chopp M. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke.* 32: 2682-8; 2001.
- Chen J.F., Sonsalla P.K., Pedata F., Melani A., Domenici M.R., Popoli P., Geiger J., Lopes L.V. and de Mendonça A. Adenosine A_{2A} receptors and brain injury: broad spectrum of neuroprotection, multifaceted actions and "fine tuning" modulation. *Prog Neurobiol.* 83(5): 310-31, 2007.
- Chen JF, Huang Z, Ma J, Zhu J, Moratalla R, Standaert D, Moskowitz MA, Fink JS, Schwarzschild MA. A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J Neurosci.* 19: 9192-200, 1999.
- Chen Y., Graham D. I., and Stone T. W. Release of endogenous adenosine and its metabolites by the activation of NMDA receptors in rat hippocampus in vivo. 106: 632; 1992
- Chen, T.H. *et al.* Dipyridamole activation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 mediates inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 cells. *Eur J Pharmacol.* 541: 138-146; 2006.
- Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol.* 6: 667-672, 1996.
- Choi DW. Limitations of in vitro models of ischemia. *Prog Clin Biol Res.* 361: 291-299, 1990.
- Chopp M., Li Y., Jiang N., Zhang R.L. and Probst J. Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 578–584, 1996.
- Choy M., Ganesan V., Thomas D.L., Thornton J.S., Proctor E., King M.D., Van der Weerd L., Gadian DG. and Lythgoe M.F. "The chronic vascular and haemodynamic response after permanent bilateral common carotid occlusion in newborn and adult rats." *J Cereb Blood Flow Metab.* 26:1066-75. 2006.
- Clark W.M., Lauten J.D., Lessov N., Woodward W. and Coull BM. The influence of antiadhesion therapies on leukocyte subset accumulation in central nervous system ischemia in rats. *J Mol Neurosci* 6: 43–50, 1995.
- Clark W.M., Lessov N., Lauten J.D. and Hazel K. Doxycycline treatment reduces ischemic brain damage in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Mol Neurosci* 9: 103–108, 1997.
- Cloues R, Jones S, Brown DA. Zn²⁺ potentiates ATP-activated currents in rat sympathetic neurons. *Pflugers Arch.* 424: 152-8; 1993.
- Cloues R. Properties of ATP-gated channels recorded from rat sympathetic neurons: voltage dependence and regulation by Zn²⁺ ions. *J Neurophysiol.* 73: 312-9; 1995.
- Clyne J.D., Wang L.F. and Hume R.I. Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X₂ purinoceptor. *J Neurosci.* 22: 3873-80; 2002.
- Coco S., Calegari F., Pravettoni E., Pozzi D., Taverna E., Rosa P., Matteoli M. and Verderio C. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem.* 278: 1354-62; 2003.

- Collo G., North R.A., Kawashima E., Merlo-Pich E., Neidhart S., Surprenant A. and Buell G. Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J Neurosci.* 16: 2495-507; 1996.
- Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brézillon S, Lannoy V, Parmentier M, Boeynaems JM. Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem.* 276: 41479-85; 2001.
- Communi D. and Boeynaems JM. Receptors responsive to extracellular pyrimidine nucleotides. *Trends Pharmacol Sci.* 18: 83-6; 1997.
- Connolly E.S. Jr, Winfree C.J., Springer T.A., Naka Y., Liao H., Yan S.D., Stern D.M., Solomon R.A., Gutierrez-Ramos J.C. and Pinsky D.J. Cerebral protection in homozygous null.ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 97: 209–216, 1996.
- Coppi E., Pugliese A.M., Stephan H., Muller C.E. and Pedata F. 2007. Role of P2 purinergic receptors in synaptic transmission under normoxic and ischaemic conditions in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Purinergic. Signal.* 3, 203-219.
- Corradetti R., Lo Conte G., Moroni F., Passani M. B. and Pepeu G. Adenosine decreases aspartate and glutamate release from rat hippocampal slices. 104: 19-26; 1984.
- Correia-de-Sa P., Sebastiao A.M. and Ribeiro J.A. Inhibitory and excitatory effects of adenosine receptor agonists on evoked transmitter release from phrenic nerve ending of the rat. 103: 1614-1620; 1991.
- Corsi C., Melani A., Bianchi L. and Pedata F. Striatal A_{2A} adenosine receptor antagonism differentially modifies striatal glutamate outflow in vivo in young and aged rats. *Neuroreport* 11: 2591–2595, 2000.
- Corsi C., Melani A., Bianchi L., Pepeu G. and Pedata F. Striatal A_{2A} adenosine receptors differentially regulate spontaneous and K⁺-evoked glutamate release in vivo in young and aged rats. *Neuroreport* 10: 687–691, 1999.
- Cunha R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38: 107–125, 2001.
- Cunha R.A., Sebastião A.M. and Ribeiro J.A. Inhibition by ATP of hippocampal synaptic transmission requires localized extracellular catabolism by ecto-nucleotidases into adenosine and channeling to adenosine A1 receptors. *J Neurosci.* 18:1987-95; 1998.
- d'Alcantara P, Ledent C, Swillens S. and Schiffmann SN. Inactivation of adenosine A_{2A} receptor impairs long term potentiation in the accumbens nucleus without altering basal synaptic transmission. *Neuroscience.* 107(3):455-464, 2001.
- Daniels R.W., Collins C.A., Chen K., Gelfand M.V., Featherstone D.E. and DiAntonio A. A single vesicular glutamate transporter is sufficient to fill a synaptic vesicle. *Neuron.* 49: 11-6; 2006.
- Danner H. and Pfister C. The cytoarchitecture of the rat globus pallidus. *J Hirnforsch.* 22: 47-57, 1981.
- Darby M, Kuzmiski JB, Panenka W, Feighan D, MacVicar BA. ATP released from astrocytes during swelling activates chloride channels. *J Neurophysiol.* 89(4):1870-7; 2003.

- Daval J.L. and Barberis C. Release of radiolabelled adenosine derivatives from superfused synaptosome beds. Evidence for the output of adenosine. *Biochem. Pharmacol.* 30, 2559-2567; 1981.
- Davies C.A., Loddick S.A., Stroemer R.P., Hunt J. and Rothwell N.J. An integrated analysis of the progression of cell responses induced by permanent focal middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Neurol.* 154: 199-212, 1998.
- Davis BH, Coll D. and Beno DW. Retinoic acid suppresses the response to platelet-derived growth factor in human hepatic Ito-cell-like myofibroblasts: a post-receptor mechanism independent of raf/fos/jun/egr activation. *Biochem J.* 294: 785-91; 1993.
- De M., Austin K. F., and Dundley M. W. Differential distribution of A3 receptor in rat brain. 1993; 19, 42-
- de Mendonça A, Sebastião AM. and Ribeiro JA. Inhibition of NMDA receptor-mediated currents in isolated rat hippocampal neurones by adenosine A1 receptor activation. *Neuroreport.* 6: 1097-1100, 1995.
- de Mendonça A. and Ribeiro JA. Adenosine inhibits the NMDA receptor-mediated excitatory postsynaptic potential in the hippocampus. *Brain Res.* 606: 351-356, 1993.
- de Mendonca A., Sebastiao A.M. and Ribeiro J.A. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33: 258-274, 2000.
- Deckert, J. and Gleiter, C. H. Adenosine--an endogenous neuroprotective metabolite and neuromodulator. 1994; 43, 23-31
- DeGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology* 51: S62-68, 1998.
- Delaney SM, Shepel PN. and Geiger JD. Levels of endogenous adenosine in rat striatum. I. Regulation by ionotropic glutamate receptors, nitric oxide and free radicals. *J Pharmacol Exp Ther.* 285: 561-567, 1998.
- Delaney SM. and Geiger JD. Levels of endogenous adenosine in rat striatum. II. Regulation of basal and N-methyl-D-aspartate-induced levels by inhibitors of adenosine transport and metabolism. *J Pharmacol Exp Ther.* 285: 568-572, 1998.
- Deuchars SA, Atkinson L, Brooke RE, Musa H, Milligan CJ, Batten TF, Buckley NJ, Parson SH, Deuchars J. Neuronal P2X7 receptors are targeted to presynaptic terminals in the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci.* 21: 7143-52; 2001.
- Di Virgilio F, Falzoni S, Chiozzi P, Sanz JM, Ferrari D, Buell GN. ATP receptors and giant cell formation. *J Leukoc Biol.* 66:723-6; 1999.
- Dietrich W.D., Nakayama H., Watson B.D., Kanemitsu H. Morphological consequences of early reperfusion following thrombotic or mechanical occlusion of the rat MCA. *Acta Neuropathol.* 78 (6): 605-14. 1989.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22: 391-397, 1999.
- Dixon A.K., Gubitz A.K., Sirinathsinghji D.J., Richardson P.J. and Freeman T.C. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol.* 118: 1461-1468, 1996
- Dobolyi A., Reichart A., Szikra T., Nyitrai G., Kekesi K.A. and Juhasz G. Sustained depolarisation induces changes in the extracellular concentrations of purine and pyrimidine nucleosides in the rat thalamus. *Neurochem. Int.* 37, 71-79; 2000.

- Domercq M, Perez-Samartin A, Aparicio D, Alberdi E, Pampliega O, Matute C. P2X7 receptors mediate ischemic damage to oligodendrocytes. *Glia*. 58: 730-40; 2010.
- Dong Y. and Benveniste E.N. Immune function of astrocytes. *Glia* 36: 180-190; 2001
- Dowdall MJ, Boyne AF, Whittaker VP. Adenosine triphosphate. A constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem J*. 140:1-12; 1974.
- Drury DR. The Liver and Carbohydrate Metabolism. *Cal West Med*. 45: 45-8; 1936.
- Drury, A. N. and Szent-Giorgyi, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian hearth. 68: 213-237; 1929.
- Dubyak GR. and el-Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol*. 265(3 Pt 1):C577-606; 1993.
- Dunwiddie T. V. and Fredholm B. B. Adenosine neuromodulation. 359-382; 1997.
- Dunwiddie T. V. and Hoffer B. J. Adenine nucleotides and synaptic transmission in the in vitro rat hippocampus. *Br J Pharmacol*. 69: 59-68; 1980.
- Dunwiddie T. V. The physiological roles of adenosine in the central nervous system. *Int Rev Neurobiol*. 27:63-139. 1985
- Dunwiddie TV, Diao L, Kim HO, Jiang JL. and Jacobson KA. Activation of hippocampal adenosine A3 receptors produces a desensitization of A1 receptor-mediated responses in rat hippocampus. *J Neurosci*. 17(2): 607-14; 1997.
- Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR. Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci*. 17(20):7673-82; 1997.
- Durukan A. and Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*. 87 (1):179-97. 2007
- Durukan A. and Tatlisumak. T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*. **87**: 179-197; 2007.
- Duval M, Beaudoin AR, Bkaily G et al. Characterization of the NTPDase activities in the mesentery pre- and post-capillary circuits of the guinea pig. *Can J Physiol Pharmacol* 81:212-219; 2003.
- Edwards F.A. Features of P2X receptor-mediated synapses in the rat brain: why doesn't ATP kill the postsynaptic cell? *Ciba Found. Symp*. 198, 278-286; 1996.
- el-Moatassim C. and Dubyak GR. A novel pathway for the activation of phospholipase D by P2z purinergic receptors in BAC1.2F5 macrophages. *J Biol Chem*. 267: 23664-73; 1992.
- Emsley HC. and Tyrrell PJ. Inflammation and infection in clinical stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 1399–1419, 2002.
- Englert M., Quitterer U. and Klotz K. N. Effector coupling of stably transfected human A₃ adenosine receptors in CHO cells. *Biochem. Pharmacol*. 64, 61–65; 2002.
- Ennaceur A., Delacour J. “A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data.” *Behav Brain Res*. 31: 47-59. 1998
- Ennion S, Hagan S, Evans RJ. The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors. *J Biol Chem*. 275: 29361-7; 2000.

- Ennion SJ, Evans RJ. Conserved cysteine residues in the extracellular loop of the human P2X(1) receptor form disulfide bonds and are involved in receptor trafficking to the cell surface. *Mol Pharmacol*. 61(2):303-11; 2002.
- Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*. 13:341-90. 1992.
- Evans RJ, Derkach V, Surprenant A. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature*. 357: 503-5; 1992.
- Evans RJ, Lewis C, Buell G, Valera S, North RA. and Surprenant A. Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Mol Pharmacol*. 48: 178-83; 1995.
- Evans RJ., Lewis C., Virginio C., Lundstrom K., Buell G., Surprenant A. and North RA. Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol*. 497: 413-22; 1996.
- Fabbro A, Skorinkin A, Grandolfo M, Nistri A, Giniatullin R. Quantal release of ATP from clusters of PC12 cells. *J Physiol*. 560(Pt 2): 505-17; 2004.
- Farkas E., Institoris A., Domoki F., Mihaly A., Bari F. The effect of pre- and post-treatment with diaxoside on the early phase of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res*. 1087:168-74. 2006.
- Fedorova I.M., Jacobson M.A., Basile A. and Jacobson K.A. Behavioral characterization of mice lacking the A3 adenosine receptor: sensitivity to hypoxic neurodegeneration. *Cell Mol Neurobiol*. 23: 431-447, 2003.
- Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, Di Virgilio F. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol*. 159: 1451-8; 1997.
- Ferrari D, Los M, Bauer MK, Vandenabeele P, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K. P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death. *FEBS Lett*. 447: 71-5; 1999.
- Ferré S, O'Connor WT, Snaprud P, Ungerstedt U and Fuxe K. Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors in the ventral striopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. *Neuroscience*. 63(3): 765-73, 1994.
- Ferré S, Torvinen M, Antoniou K, Irenius E, Civelli O, Arenas E, Fredholm BB. and Fuxe K. Adenosine A1 receptor-mediated modulation of dopamine D1 receptors in stably cotransfected fibroblast cells. *J Biol Chem*. 273(8): 4718-24, 1998.
- Fiebich B. L., Biber K., Lieb K., Van Calker D., Berger M., Bauer J., and Gebicke-Haerter P. J. Cyclooxygenase-2 expression in rat microglia is induced by adenosine A2a-receptors. 18: 152-160; 1996.
- Filippov AK, Webb TE, Barnard EA. and Brown DA. Dual coupling of heterologously-expressed rat P2Y6 nucleotide receptors to N-type Ca²⁺ and M-type K⁺ currents in rat sympathetic neurones. *Br J Pharmacol*. 126: 1009-17; 1999.
- Filippov AK., Brown DA. and Barnard EA. The P2Y(1) receptor closes the N-type Ca(2+) channel in neurones, with both adenosine triphosphates and diphosphates as potent agonists. *Br J Pharmacol*. 129: 1063-6; 2000.
- Finn SF, Swartz KJ. and Beal MF. 2-Chloroadenosine attenuates NMDA, kainate, and quisqualate toxicity. *Neurosci Lett*. 126:191-4, 1991.

- Forsyth KM, Bjur RA, Westfall DP. Nucleotide modulation of norepinephrine release from sympathetic nerves in the rat vas deferens. *J Pharmacol Exp Ther*. 256: 821-6; 1991.
- Fossetta J., Deno G., Gonsiorek W., Fan X., Lavey B., Das P., Lunn C., Zavodny P.J., Lundell D. and Hipkin R.W. Pharmacological analysis of calcium responses mediated by the human A₃ adenosine receptor in monocyte-derived dendritic cells and recombinant cells. *Mol. Pharmacol*. 63, 342–350; 2003.
- Franco, R., Canela, E. I., and Bozal, J. *Heterogeneous localization of some purine enzymes in subcellular fractions of rat brain and cerebellum*. 11: 423-435; 1986.
- Fredholm B. B., IJzerman A. P., Jacobson K. A., Klotz K. N. and Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev*. 53, 527–552; 2001.
- Fredholm B. B., Sollevi A., Vernet L., and Hedqvist P. Inhibition by dipyridamole of stimulate purine release. 313: R18; 1980.
- Fredholm B.B., Cunha R.A. and Svenningsson P. Pharmacology of adenosine A(2A) receptors and therapeutic applications. *Curr. Top. Med. Chem*. 3: 413–426, 2003.
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev*. 46: 143-56; 1994.
- Fredholm BB, Lindgren E, Lindström K, Nordstedt C. Alpha-adrenoceptor stimulation, but not muscarinic stimulation, increases cyclic AMP accumulation in brain slices due to protein kinase C mediated enhancement of adenosine receptor effects. *Acta Physiol Scand*. 131: 543-551, 1987.
- Fredholm BB. and Dunwiddie TV. How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol Sci*. 9(4):130-134, 1988.
- Gao Z., Li B. S., Day Y. J. and Linden J. A₃ adenosine receptor activation triggers phosphorylation of protein kinase B and protects rat basophilic leukemia 2H3 mast cells from apoptosis. *Mol. Pharmacol*. 59, 76–82; 2001.
- Gao Z.G., Blaustein J., Gross A.S., Melman N. and Jacobson K.A. N⁶-Substituted adenosine derivatives: selectivity, efficacy, and species differences at A₃ adenosine receptors, *Biochem. Pharmacol*. 65, 1675–1684; 2003.
- Gao Z.G., Kim S.K., Biadatti T., Chen W., Lee K., Barak D., Kim S.G., Johnson C.R. and Jacobson K.A. Structural determinants of A₃ adenosine receptor activation: Nucleoside ligands at the agonist/antagonist boundary. *J. Med. Chem*. 45, 4471–4484; 2002.
- Garau A, Bertini R, Colotta F, Casilli F, Bigini P, Cagnotto A, Mennini T, Ghezzi P, Villa P. Neuroprotection with the CXCL8 inhibitor repertaxin in transient brain ischemia. *Cytokine* 30: 125–131, 2005.
- Garcia, J.H., Wagner, S., Liu, K.F., Hu, X.J., 1995. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke*. 26, 627-634.
- Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, Arumugam TV, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T: Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 40:1849-1857, 2009.

- Gendron FP, Benrezzak O, Krugh BW, Kong Q, Weisman GA, Beaudoin AR. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. *Curr Drug Targets*. 3: 229-45; 2002.
- Gendron FP, Halbfinger E, Fischer B, Beaudoin AR. Inhibitors of NTPDase: key players in the metabolism of extracellular purines. *Adv Exp Med Biol*. 486: 119-23; 2000.
- Gerwins P. and Fredholm B.B. Stimulation of adenosine A1 receptors and bradykinin receptors, which act via different G proteins, synergistically raises inositol 1,4,5-triphosphate and intracellular free calcium in DDTI MF-2 smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89: 7330-7334, 1992
- Giffard RG. and Swanson RA. Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes. *Glia*. 50: 299-306; 2005.
- Gillespie P.G., Beavo J.A. "Inhibition and stimulation of photoreceptor phosphodiesterases by dipyrindimole and M&B 22,948." *Mol Pharmacol*. 36:773-81. 1989.
- Giovannini M.G., Blitzer R.D., Wong T., Asoma K., Tsokas P., Morrison J.H., Iyengar R. and Landau E.M. Mitogen-activated protein kinase regulates early phosphorylation and delayed expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in long-term potentiation. *J. Neurosci*. 21: 7053-7062; 2001.
- Giustizieri M.L., Albanesi C., Scarponi C., et al. Nitric oxide donors suppress chemokine production by keratinocytes in vitro and in vivo. *Am J Pathol*. 161:1409-18. 2002.
- Goncalves M. L., Cunha R. A., and Ribeiro J. A. Adenosine A2A receptors facilitate 45Ca²⁺ uptake through class A calcium channels in rat hippocampal CA3 but not CA1 synaptosomes. 238: 73-77; 1997.
- Gordon JL. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J*. 233: 309-19; 1986.
- Greene RW. and Haas HL. The electrophysiology of adenosine in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*. 36: 329-41, 1991.
- Grenz A, Zhang H, Hermes M, Eckle T, Klingel K, Huang DY, Müller CE, Robson SC, Osswald H, Eltzschig HK. Contribution of E-NTPDase1 (CD39) to renal protection from ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*. 21: 2863-73; 2007.
- Griffiths RJ, Stam EJ, Downs JT, Otterness IG. ATP induces the release of IL-1 from LPS-primed cells in vivo. *J Immunol*. 154: 2821-8; 1995.
- Grondal EJ, Janetzko A, Zimmermann H. Monospecific antiserum against 5'-nucleotidase from Torpedo electric organ: immunocytochemical distribution of the enzyme and its association with Schwann cell membranes. *Neuroscience*. 24: 351-63; 1988.
- Gualix J, Pintor J, Miras-Portugal MT. Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *J Neurochem*. 73: 1098-104; 1999.
- Gubitz, A. K., Widdowson, L., Kurokawa, M., Kirkpatrick, K. A., and Richardson, P. J. Dual signalling by the adenosine A2a receptor involves activation of both N- and P-type calcium channels by different G proteins and protein kinases in the same striatal nerve terminals. 67: 374-381; 1996.
- Guillén-Gómez E., Calbet M., Casado J., de Lecea L., Soriano E., Pastor-Anglada M., and Burgaya F. Distribution of CNT2 and ENT1 transcripts in rat brain: selective decrease of CNT2 mRNA in the cerebral cortex of sleep-deprived rats. *J. Neurochem*. 90: 883-893; 2004.

- Haley JE, Delmas P, Offermanns S, Abogadie FC, Simon MI, Buckley NJ, Brown DA. Muscarinic inhibition of calcium current and M current in Galpha q-deficient mice. *J Neurosci.* 20: 3973-9; 2000.
- Hallenbeck JM. Significance of the inflammatory response in brain ischemia. *Acta Neurochir Suppl* 66: 27-31, 1996.
- Han B.H. and Holtzman D.M. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J. Neurosci.* 20: 5775-5781, 2000.
- Harada J. and Sugimoto M. Activation of caspase-3 in beta-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons. *Brain Res.* 842(2): 311-323, 1999.
- Harden TK., Lazarowski ER. and Boucher RC. Release, metabolism and interconversion of adenine and uridine nucleotides: implications for G protein-coupled P2 receptor agonist selectivity. *Trends Pharmacol Sci.* 18: 43-6; 1997.
- Harms H. H., Wardeh G., and Mulder, A. H. Adenosine modulates depolarization-induced release of 3H-noradrenaline from slices of rat brain neocortex. 49: 305-308; 1978.
- Harms H. H., Wardeh G., and Mulder, A. H. Effect of adenosine on depolarization-induced release of various radiolabelled neurotransmitters from slices of rat corpus striatum. 18: 577-580; 1979.
- Hartmann M., Heumann R. and Lessmann V. Synaptic secretion of BDNF after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *EMBO J.* 20: 5887-5897, 2001.
- Hasenknopf B. Polyoxometalates: introduction to a class of inorganic compounds and their biomedical applications. *Front Biosci.* 10: 275-87; 2005.
- Heidland U.E., Heintzen M.P., Michel C.J., Strauer B.E. Adjunctive intracoronary dipyridamole in the interventional treatment of small coronary arteries: a prospectively randomized trial. *Am Heart J.* 139:1039-45. 2000.
- Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur J Biochem.* 262: 102-7; 1999.
- Henrichs K.J., Matsuoka H., Schaper W. "Mode of action of adenosine-potentiating vasodilators." In: Berne RM., Frall TW., Rubio R. eds. *Regulatory Function of Adenosine.* Boston: Nijhoff. 517-23. 1983.
- Hentschel S, Lewerenz A, Nieber K. Activation of A(3) receptors by endogenous adenosine inhibits synaptic transmission during hypoxia in rat cortical neurons. *Restor Neurol Neurosci.* 21: 55-63, 2003
- Hille B. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 17: 531-6; 1994.
- Hirano D., Aoki Y., Ogasawara H., Kodama H., Waga I., Sakanaka C., Shimizu T. and Nakamura M. Functional coupling of adenosine A2a receptor to inhibition of the mitogen-activated protein kinase cascade in Chinese hamster ovary cells. 316: 81-86; 1996.
- Hoehn K. and White T.D. Role of excitatory amino acid receptors in K⁺- and glutamate-evoked release of endogenous adenosine from rat cortical slices. *J. Neurochem.* 54, 256-265; 1990.
- Hollingsworth EB, Sears EB. and Daly JW. An activator of protein kinase C (phorbol-12-myristate-13-acetate) augments 2-chloroadenosine-elicited accumulation of cyclic AMP in guinea pig cerebral cortical particulate preparations. *FEBS Lett.* 184: 339-342, 1985.

- Hollins, C. and Stone, T. W. Characteristics of the release of adenosine from slices of rat cerebral cortex. 303: 73-82; 1980.
- Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*. 409: 202-7; 2001.
- Holton P. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol*. 145: 494-504; 1959.
- Hossman K.A. Periinfarct depolarization. *Cerebrovesc. Brian Metab. Rev*. 8: 195-208, 1996.
- Hossmann K.A. Thresholds of ischemic injury. In: Ginsberg, M.D., Bogousslavsky, J. (Eds.), *Cerebrovascular Disease. Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment*, vol. 1. Blackwell Science, Malden, MA, USA, pp. 193–204, 1998.
- Hoyle CH, Chapple C. and Burnstock G. Isolated human bladder: evidence for an adenine dinucleotide acting on P2X-purinoceptors and for purinergic transmission. *Eur J Pharmacol*. 174: 115-8; 1989.
- Hoyle CH. Pharmacological activity of adenine dinucleotides in the periphery: possible receptor classes and transmitter function. *Gen Pharmacol*. 21: 827-31; 1990.
- Hu B, Senkler C, Yang A, Soto F, Liang BT. P2X4 receptor is a glycosylated cardiac receptor mediating a positive inotropic response to ATP. *J Biol Chem*. 277(18):15752-7; 2002.
- Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ: Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol*. 66:232-245; 2006.
- Huang J., Agus D.B., Winfree C.J., Kiss S., Mack W.J., McTaggart R.A., Choudhri T.F., Kim L.J., Mocco J., Pinsky D.J., Fox W.D., Israel R.J., Boyd T.A., Golde D.W., Connolly Jr., E.S. Dehydroascorbic acid, a blood–brain barrier transportable form of vitamin C, mediates potent cerebroprotection in experimental stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 98: 11720–11724, 2001.
- Huang J., Choudhri T.F., Winfree C.J., McTaggart R.A., Kiss S., Mocco J., Kim L.J., Protopsaltis T.S., Zhang Y., Pinsky D.J. and Connolly Jr., E.S. Postischemic cerebrovascular E-selectin expression mediates tissue injury in murine stroke. *Stroke* 31: 3047–3053, 2000.
- Hughes, P.M. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab*. 22: 308-317; 2002.
- Hung K.Y., Shyu R.S., Fang C.C., Tsai C.C., Lee P.H., Tsai T.J., Hsieh B.S. Dipyrindamole inhibits human peritoneal mesothelial cell proliferation in vitro and attenuates rat peritoneal fibrosis in vivo. *Kidney Int*. 59 (6):2316-24. 2001
- Idé C. and Saito T. Electron microscopic histochemistry of ATPase and alkaline phosphatase activities in mouse digital corpuscles. *J Neurocytol*. 9: 207-18; 1980.
- IJzerman, A. P., van der Wenden, E. M., van Galen, P. J., and Jacobson, K. A. Molecular modeling of adenosine receptors. The ligand binding site on the rat adenosine A2A receptor. 268: 95-104; 1994.
- Illes P. and Ribeiro JA. Neuronal P2 receptors of the central nervous system. *Curr Top Med Chem*. 4: 831-8; 2004.
- Impagnatiello F., Bastia E., Ongini E. and Monopoli A. Adenosine receptors in neurological disorders. 4: 635-664, 2000.

- Inbe H, Watanabe S, Miyawaki M, Tanabe E. and Encinas JA. Identification and characterization of a cell-surface receptor, P2Y₁₅, for AMP and adenosine. *J Biol Chem.* 279: 19790-9; 2004.
- Iqbal J., Vollmayer P., Braun N., Zimmermann H. and Müller CE. A capillary electrophoresis method for the characterization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases) and the analysis of inhibitors by in-capillary enzymatic microreaction. *Purinergic Signal.* 1: 349-58; 2005.
- Irving E.A. and Bamford M. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22: 631–647, 2002.
- Iuliano L., Pedersen J.Z., Rotilio G., Ferro D., Violi F. E potent chain-breaking antioxidant activity of the cardiovascular drug dipyridamole. *Free Radic Biol Med.* 18:239-47. 1995.
- Iuliano L., Violi F., Ghiselli A., Alessandri C., Balsano F. Dipyridamole inhibits lipid peroxydation and scavenges oxygen radicals. *Lipids.* 24:430-3. 1989.
- Jacobson K.A. A₃ adenosine receptors: novel ligands and paradoxical effects. *Trends Pharmacol. Sci* 19: 184–191, 1998.
- Jacobson K.A., Nikodijević O., Padgett W.L., Gallo-Rodriguez C., Maillard M. and Daly J.W. 8-(3-Chlorostyryl)caffeine (CSC) is a selective A₂-adenosine antagonist in vitro and in vivo. *FEBS Lett.* 323: 141-144, 1993a.
- Jacobson KA, Hoffmann C, Kim YC, Camaioni E, Nandanan E, Jang SY, Guo DP, Ji XD, von Kügelgen I, Moro S, Ziganshin AU, Rychkov A, King BF, Brown SG, Wildman SS, Burnstock G, Boyer JL, Mohanram A, Harden TK. Molecular recognition in P2 receptors: ligand development aided by molecular modeling and mutagenesis. *Prog Brain Res.* 120: 119-32; 1999.
- Jacobson, K. A., van Galen, P. J., and Williams, M. Adenosine receptors: pharmacology, structure-activity relationships, and therapeutic potential. 35, 407-422; 1992.
- James S, Richardson PJ. Production of adenosine from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse. *J Neurochem.* 60: 219-27; 1993.
- Jarvis M.F. and Williams M. Direct autoradiographic localization of adenosine A₂ receptors in the rat brain using the A₂-selective agonist, [3H]CGS 21680. *Eur J Pharmacol.* 168: 243-246, 1989.
- Jeong L.S., Jin D.Z., Kim H.O., Shin D.H., Moon H.R., Gunaga P., Chun M.W., Kim Y.C., Melman N., Gao Z.G. and Jacobson K.A. N⁶-Substituted D-4'-thioadenosine-5'-methyluronamides: potent and selective agonists at the human A₃ adenosine receptor. *J. Med. Chem.* 46: 3775–3777, 2003.
- Jhamandas, K. and Dumbrille, A. Regional release of [3H]adenosine derivatives from rat brain in vivo: effect of excitatory amino acids, opiate agonists, and benzodiazepines. 58: 1262-1278; 1980.
- Jiang LH, Rassendren F, Surprenant A, North RA. Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *J Biol Chem.* 275: 34190-6; 2000.
- Jo YH, Role LW. Coordinate release of ATP and GABA at in vitro synapses of lateral hypothalamic neurons. *J Neurosci.* 22: 4794-804; 2002.
- Jo YH, Schlichter R. Synaptic corelease of ATP and GABA in cultured spinal neurons. *Nat Neurosci.* 2: 241-5; 1999.

- Jones L.F., Landas S.K., Johnson A.K. Measurement of coronary blood flow velocity in conscious rats. *Am J Physiol.* 266 (2 Pt 2):H840-5. 1994
- Jones P.A., Smith R.A. and Stone T.W. Protection against kainate-induced excitotoxicity by adenosine A2A receptor agonists and antagonists. *Neuroscience* 85: 229–237, 1998.
- Jonzon, B. and Fredholm, B. B. Release of purines, noradrenaline, and GABA from rat hippocampal slices by field stimulation. 44: 217-224; 1985.
- Kaczmarek E, Koziak K, Sévigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH, Robson SC. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem.* 271: 33116-22; 1996.
- Kammermeier PJ, Ruiz-Velasco V. and Ikeda SR. A voltage-independent calcium current inhibitory pathway activated by muscarinic agonists in rat sympathetic neurons requires both Galpha q/11 and Gbeta gamma. *J Neurosci.* 20: 5623-9; 2000.
- Kanjhan R, Housley GD, Burton LD, Christie DL, Kippenberger A, Thorne PR, Luo L, Ryan AF. Distribution of the P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channels in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 407:11-32; 1999.
- Kaplan B., Brint S., Tanabe J., Jacewicz M., Wang X.J., Pulsinelli W. “Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia.” *Stroke.* 22: 1032-39. 1991.
- Karpiak S.E., Tagliavia A., Wakade C.G. “Animal models for the study of drugs in ischemic stroke.” *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 29: 403-14. 1989.
- Kawamata, T. *et al.* Intracisternal basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances behavioral recovery following focal cerebral infarction in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16: 542-547; 1996.
- Kegel B, Braun N, Heine P, Maliszewski CR, Zimmermann H. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology.* 36: 1189-200; 1997.
- Kelly RB. Storage and release of neurotransmitters. *Cell.* 72 Suppl:43-53; 1993.
- Kennedy C. P1- and P2-purinoceptor subtypes--an update. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 303: 30-50; 1990.
- Kessey, K., Trommer, B. L., Overstreet, L. S., Ji, T., and Mogul, D. J. A role for adenosine A2 receptors in the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. 756: 184-190, 1997.
- Khakh BS, Burnstock G, Kennedy C, King BF, North RA, Séguéla P, Voigt M, Humphrey PP. International union of pharmacology. XXIV. Current status of the nomenclature and properties of P2X receptors and their subunits. *Pharmacol Rev.* 53: 107-18; 2001.
- Khakh BS. Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat Rev Neurosci.* 2: 165-74; 2001.
- Kim J.A., Tran N.D., Zhou W., Fisher M. Dipyridamole enhances tissue plasminogen activator release by brain capillary endothelial cells. *Thrombosis Research.* 115: 435-8. 2005.
- Kim S.G., Ravi G., Hoffmann C., Jung Y.J., Kim M., Chen A. and Jacobson K.A. p53-Independent induction of Fas and apoptosis in leukemic cells by an adenosine derivative, Cl-B-MECA. *Biochem. Pharmacol.* 63: 871–880, 2002.

- Kim, J., Wess, J., van Rhee, A. M., Schoneberg, T., and Jacobson, K. A. Site-directed mutagenesis identifies residues involved in ligand recognition in the human A2a adenosine receptor. 270: 13987-13997; 1995.
- Kirino T. Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.* 239:57-69. 1982.
- Kirley TL. Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase. Homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *J Biol Chem.* 272: 1076-81; 1997.
- Kitazake M., Minamino T., Node K., et al. "Elevation of plasma adenosine levels may attenuate the severity of chronic heart failure." *Cardiovasc Drugs Ther.* 12:307-9. 1998.
- Klabunde R.E. Dipyridamole inhibition of adenosine metabolism in human blood. *Eur J Pharmacol.* 93: 21-26. 1993.
- Klyuch B.P., Richardson M.J., Dale N. and Wall M.J. The dynamics of single spike evoked adenosine release in the cerebellum. *J. Physiol.* 589, 283-295; 2011.
- Köhler D, Eckle T, Faigle M, Grenz A, Mittelbronn M, Laucher S, Hart ML, Robson SC, Müller CE, Eltzhig HK. CD39/ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during cardiac ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 116: e514; 2007.
- Kohno Y., Sei Y., Koshiha M., Kim H. O. & Jacobson K. A. Induction of apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by adenosine A₃ receptor agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 904–910; 1996.
- Koizumi S., Ikeda M., Inoue K., Nakazawa K. and Inoue K. Enhancement by zinc of ATP-evoked dopamine release from rat pheochromocytoma PC12 cells. *Brain Res.* 673: 75-82; 1995.
- Koshimizu T, Koshimizu M, Stojilkovic SS. Contributions of the C-terminal domain to the control of P2X receptor desensitization. *J Biol Chem.* 274: 37651-7; 1999.
- Kostopoulos, G. K., Limacher, J. J., and Phillis, J. W. Action of various adenine derivatives on cerebellar Purkinje cells. 88: 162-165; 1975.
- Kozak A., Ergul A., El-Remessy A.B., Johnson M.H., Macado L.S., Elewa H.F., Abdelsaid M., Wiley D.C., Fagan S.C. Candesartan augments ischemia-induced proangiogenic state and results in sustained improvement after stroke. *Stroke.* 40: 1870-6. 2009
- Kreutzberg GW, Barron KD. 5'-Nucleotidase of microglial cells in the facial nucleus during axonal reaction. *J Neurocytol.* 7: 601-10; 1978.
- Kuroda Y., Saito M., and Kobayashi K. Concomitant changes in cyclic AMP level and postsynaptic potentials of olfactory cortex slices induced by adenosine derivatives. 109: 196-201; 1976.
- Lämmer A., Günther A., Beck A., Krügel U., Kittner H., Schneider D., Illes P. and Franke H. Neuroprotective effects of the P2 receptor antagonist PPADS on focal cerebral ischaemia-induced injury in rats. *Eur. J. Neurosci.* 23, 2824-2848; 2006.
- Lange K, Brandt U. Rapid uptake of calcium, ATP, and inositol 1,4,5-trisphosphate via cation and anion channels into surface-derived vesicles from HIT cells containing the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium store. *FEBS Lett.* 325: 205-9; 1993.
- Latini S. and Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* 79: 463-484; 2001.

- Latini S., Corsi C., Pedata F., and Pepeu G. The source of brain adenosine outflow during ischemia and electrical stimulation. *27*: 239-244; 1995.
- Latini S., Pazzagli M., Pepeu G., and Pedata F. A2 adenosine receptors: their presence and neuromodulatory role in the central nervous system. *27*, 925-933; 1996.
- Lazarowski ER, Shea DA, Boucher RC, Harden TK. Release of cellular UDP-glucose as a potential extracellular signaling molecule. *Mol Pharmacol.* 63: 1190-7; 2003.
- Lazarowski ER, Shea DA, Boucher RC. and Harden TK. Release of cellular UDP-glucose as a potential extracellular signaling molecule. *Mol Pharmacol.* 63: 1190-7; 2003.
- Le Feuvre RA, Brough D, Iwakura Y, Takeda K, Rothwell NJ. Priming of macrophages with lipopolysaccharide potentiates P2X7-mediated cell death via a caspase-1-dependent mechanism, independently of cytokine production. *J Biol Chem.* 277: 3210-8; 2002.
- Lê KT, Babinski K, Séguéla P. Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J Neurosci.* 18: 7152-9; 1998.
- Lee DA, Witzemann V. Photoaffinity labeling of a synaptic vesicle specific nucleotide transport system from *Torpedo marmorata*. *Biochemistry.* 22: 6123-30; 1983.
- Lee H., Park J.W., Kim S.P., Lo E.H., Lee S.R. Doxycycline inhibits matrix metalloproteinase-9 and laminin degradation after transient global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.* 34: 189-98; 2009.
- Lee Y.C., Chien C.L., Sun C.N., Huang C.L., Huang N.K., Chiang M.C., Lai H.L., Lin Y.S., Chou S.Y., Wang C.K., Tai M.H., Liao W.L., Lin T.N., Liu F.C. and Chern Y., Characterization of the rat A2A adenosine receptor gene: a 4, 8-kb promoter-proximal DNA fragment confers selective expression in the central nervous system, *Eur. J. Neurosci.* 18: 1786–1796; 2003.
- Lewen A., Matz P. and Chan P.H. Free radical pathways in CNS injury. *J. Neurotrauma* 17: 871–890, 2000.
- Lewis C, Neidhart S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature.* 377: 432-5; 1995.
- Li C, Peoples RW, Li Z. and Weight FF. Zn²⁺ potentiates excitatory action of ATP on mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 8264-7; 1993.
- Li C, Peoples RW, Weight FF. Proton potentiation of ATP-gated ion channel responses to ATP and Zn²⁺ in rat nodose ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 76(5): 3048-58; 1996.
- Li C, Peoples RW. and Weight FF. Enhancement of ATP-activated current by protons in dorsal root ganglion neurons. *Pflugers Arch.* 433: 446-54; 1997.
- Li GZ, Zhong D, Yang LM, Sun B, Zhong ZH, Yin YH, Cheng J, Yan BB, Li HL. Expression of interleukin-17 in ischemic brain tissue. *Scand J Immunol* 62: 481–486, 2005.
- Linden J. Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. *Mol Pharmacol.* 67: 1385-7; 2005.
- Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC. and Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. *Stroke* 25: 1481–1488, 1994 .
- Lloyd H.G., Lindström K. and Fredholm B.B. Intracellular formation and release of adenosine from rat hippocampal slices evoked by electrical stimulation or energy depletion. *Neurochem. Int.* 23, 173-185; 1993.

- Loesch A, Miah S, Burnstock G. Ultrastructural localisation of ATP-gated P2X2 receptor immunoreactivity in the rat hypothalamo-neurohypophysial system. *J Neurocytol.* 28: 495-504; 1999.
- Loftus I.M., Naylor A.R., Bell P.R., Thompson M.M. Plasma MMP-9: a marker of carotid plaque instability. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 21: 17-21; 2001.
- Logan M. and Sweeney MI. Adenosine A1 receptor activation preferentially protects cultured cerebellar neurons versus astrocytes against hypoxia-induced death. *Mol Chem Neuropathol.* 31: 119-133, 1997.
- Londos C., Cooper D. M. and Wolff J. Subclasses of external adenosine receptors. 77, 2551-2554; 1980.
- Longa E. Z., Weinstein P. R., Carlson S. and Cummins R. *Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats.* 20, 84-91; 1989.
- Lopes L.V., Rebola N., Pinheiro P.C., Richardson P.J., Oliveira C.R. and Cunha R.A. Adenosine A3 receptors are located in neurons of the rat hippocampus. *Neuroreport.* 14: 1645-1648, 2003.
- Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27: 267-282, 2003.
- Lu X.C., Williams A.J., Wagstaff J.D., Tortella F.C. and Hartings J.A. Effects of delayed intrathecal infusion of an NMDA receptor antagonist on ischemic injury and peri-infarct depolarizations. *Brain Res.* 1056: 200-208, 2005.
- Luqmani YA. Nucleotide uptake by isolated cholinergic synaptic vesicles: evidence for a carrier of adenosine 5'-triphosphate. *Neuroscience.* 6: 1011-21; 1981.
- Macek TA, Schaffhauser H, Conn PJ. Protein kinase C and A3 adenosine receptor activation inhibit presynaptic metabotropic glutamate receptor (mGluR) function and uncouple mGluRs from GTP-binding proteins. *J Neurosci.* 18: 6138-6146, 1998.
- MacManus J.P. and Linnik M.D. Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17: 815-832, 1997.
- Malm T., Ort M., Tahtivaara L., Jukarainen N., Goldsteins G., Poulivali J., Nurmi A., Pussinen R., Ahtoniemi T., Miettinen T.K., Kanninen K., Leskinen S., Vartiainen N., Yrjanheikki J., Laatikainen R., Harris-White M.E., Koistinaho M., Frautschy S.A., Bures J., Koistinaho J. "β-amyloid infusion results in delayed and age-dependent learning deficits without role of inflammation or β-amyloid deposits." *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 8852-7. 2006
- Marcoli M., Raiteri L., Bonfanti A., Monopoli A., Ongini E., Raiteri M. and Maura G. Sensitivity to selective adenosine A1 and A2A receptor antagonists of the release of glutamate induced by ischemia in rat cerebrocortical slices. *Neuropharmacol* 45: 201-210, 2003.
- Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Olson KE, Islam N, Pinsky DJ and Levi R. Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Semin Thromb Hemost.* 31:234-46, 2005.
- Marosi M., Rakos G., Robotka H., Nemeth H., Sas K., Kis Z., Farkas T., Lur G., Vecsei L., Toldi J. Hippocampal (CA1) activities in Wistar rats from different vendors. Fundamental differences in acute ischemia. *J Neurosci Methods.* 156: 231-5. 2006.
- Mateo J, Harden TK, Boyer JL. Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Br J Pharmacol.* 128: 396-402; 1999.

- Maurice T., Su T.P., Parish D.W., Nabeshima T., Privat A. PRE-084, a sigma selective PCP derivative, attenuates MK-801-induced impairment of learning in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 49: 859-69. 1994
- McMillian MK, Soltoff SP, Cantley LC, Rudel R, Talamo BR. Two distinct cytosolic calcium responses to extracellular ATP in rat parotid acinar cells. *Br J Pharmacol.* 108: 453-61; 1993.
- Meghji, P. and Newby, A. C. Sites of adenosine formation, activation and inactivation in the brain. 16: 227-232; 1990.
- Meghji, P. Storage, release, uptake, and inactivation of purine. 28: 214-219; 1993.
- Meghji, P., Tuttle, J. B., and Rubio, R. Adenosine formation and release by embryonic chick neurons and glia in cell culture. 53: 1852-1860; 1989.
- Melani A, Cipriani S, Vannucchi MG, Nosi D, Donati C, Bruni P, Giovannini MG, Pedata F. Selective adenosine A_{2A} receptor antagonism reduces JNK activation in oligodendrocytes after cerebral ischaemia. *Brain.* 132: 1480-95; 2009.
- Melani, A., Gianfriddo, M., Vannucchi, M. G., Cipriani, S., Baraldi, P. G., Giovannini, M. G., and Pedata, F. The selective A_{2A} receptor antagonist SCH 58261 protects from neurological deficit, brain damage and activation of p38 MAPK in rat focal cerebral ischemia. 1073-1074, 470-480; 2006.
- Melani, A., Pantoni, L., Bordoni, F., Gianfriddo, M., Bianchi, L., Vannucchi, M. G., Bertorelli, R., Monopoli, A., and Pedata, F. The selective A_{2A} receptor antagonist SCH 58261 reduces striatal transmitter outflow, turning behavior and ischemic brain damage induced by permanent focal ischemia in the rat. 959, 243-250; 2003.
- Melani, A., Pantoni, L., Corsi, C., Bianchi, L., Monopoli, A., Bertorelli, R., Pepeu, G., Pedata, F. Striatal outflow of adenosine, excitatory amino acids, gamma-aminobutyric acid, and taurine in awake freely moving rats after middle cerebral artery occlusion: correlations with neurological deficit and histopathological damage. *Stroke.* 30, 2448-2454; 1999.
- Melani, A., Turchi, D., Vannucchi, M.G., Cipriani, S., Gianfriddo, M., Pedata, F., 2005. ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia. *Neurochem. Int.* 47, 442-448.
- Metha J., Metha P. Dipyridamole and aspirin in relation to platelet aggregation and vessel wall prostaglandin generation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 4:688-93. 1982.
- Michaelis, M. L., Michaelis, E. K., and Myers, S. L. Adenosine modulation of synaptosomal dopamine release. 24, 2083-2092; 1979.
- Mies G., Iijima T. and Hossmann K.A. Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport.* 4: 709-711, 1993.
- Mishina M., Sakimura K., Mori H., Kushiya E., Harabayashi M., Uchino S. and Nagahari K. A single amino acid residue determines the Ca²⁺ permeability of AMPA-selective glutamate receptor channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 180: 813-821, 1991.
- Mogul D.J., Adams M.E. and Fox A.P. Differential activation of adenosine receptors decreases N-type but potentiates P-type Ca²⁺ current in hippocampal CA3 neurons. *Neuron.* 10: 327-334, 1993.
- Mohr R., Rath S., Meir O., Smolinsky A., Har-Zahav Y., Neufeld H.N., Goor D.A. Changes in systemic vascular resistance detected by the arterial resistometer: preliminary report of a new

- method tested during percutaneous transluminal coronary angioplastic. *Circulation*. 74: 780-5. 1986.
- Moir TW. and Downs TD. Myocardial reactive hyperemia: comparative effects of adenosine, ATP, ADP, and AMP. *Am J Physiol*. 222: 1386-90; 1972.
- Monopoli A., Lozza G., Forlani A., Mattavelli A. and Ongini E. Blockade of A_{2A} adenosine receptors by SCH 58261 results in neuroprotective effects in cerebral ischaemia in rats. *NeuroReport* 9: 3955–3959, 1998.
- Moore DJ, Chambers JK, Wahlin JP, Tan KB, Moore GB, Jenkins O, Emson PC. and Murdock PR. Expression pattern of human P_{2Y} receptor subtypes: a quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction study. *Biochim Biophys Acta*. 1521: 107-19; 2001.
- Moreau J. L. and Huber G. Central adenosine A_(2A) receptors: an overview. 31, 65-82; 1999.
- Morel N. and Meunier FM. Simultaneous release of acetylcholine and ATP from stimulated cholinergic synaptosomes. *J Neurochem*. 36: 1766-73; 1981.
- Mori M, Heuss C, Gähwiler BH. and Gerber U. Fast synaptic transmission mediated by P_{2X} receptors in CA3 pyramidal cells of rat hippocampal slice cultures. *J Physiol*. 535: 115-23; 2001.
- Mori T, Town T, Kobayashi M, Tan J, Fujita SC. and Asano T. Augmented delayed infarct expansion and reactive astrogliosis after permanent focal ischemia in apolipoprotein E4 knock-in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 24: 646-56; 2004.
- Morioka T., Kolehmainen A.N. and Streit W.J. Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Comp Neurol*. 327: 123-132, 1993.
- Morisaki N., Stitts J.M., Bartels-Tomei L., et al. Dipyridamole: an antioxidant that promotes the proliferation of aorta smooth muscle cells. *Artery*. 11: 88-107. 1982.
- Mosca S.M., Gelpi R.J., Cingolani H.E. Adenosine and dipyridamole mimic the effects of ischemic preconditioning. *J Moll Cell Cardiol*. 26: 1403-9. 1994.
- Moss SJ. and Smart TG. Modulation of amino acid-gated ion channels by protein phosphorylation. *Int Rev Neurobiol*. 39: 1-52; 1996.
- Moss SJ. and Smart TG. Modulation of amino acid-gated ion channels by protein phosphorylation. *Int Rev Neurobiol*. 39:1-52; 1996.
- Müller CE. P₂-pyrimidinergic receptors and their ligands. *Curr Pharm Des*. 8: 2353-69; 2002.
- Mulas A., Crabai F., Pepeu G. The influence of repeated experience on the effect of scopolamine and of amphetamine on exploratory behavior in the rat. *Pharmacol Res Commun*. 2: 169-76. 1970
- Muller C.E., Iqbal J., Baqi Y., Zimmermann H., Rollich A. and Stephan, H. Polyoxometalates-a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 16: 5943-5947; 2006.
- Nadareishvili Z.G., Li H., Wright V., Maric D., Warach S., Hallenbeck J.M., Dambrosia J., Barker J.L. and Baird A.E. Elevated pro-inflammatory CD4⁺CD28⁻ lymphocytes and stroke recurrence and death. *Neurology* 63: 1446–1451, 2004.
- Nakatsuka T, Gu JG. ATP P_{2X} receptor-mediated enhancement of glutamate release and evoked EPSCs in dorsal horn neurons of the rat spinal cord. *J Neurosci*. 21: 6522-31; 2001.
- Nakazawa K. and Hess P. Block by calcium of ATP-activated channels in pheochromocytoma cells. *J Gen Physiol*. 101(3):377-92; 1993.

- Namura S., Iihara K., Takami S., Nagata I., Kikuchi H., Matsushita K., Moskowitz M.A., Bonventre J.V. and Alessandrini A. Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 11569–11574, 2001
- Neary JT, Laskey R, van Breemen C, Blicharska J, Norenberg LO. and Norenberg MD. ATP-evoked calcium signal stimulates protein phosphorylation/dephosphorylation in astrocytes. *Brain Res.* 566: 89-94; 1991.
- Neary JT, van Breemen C, Forster E, Norenberg LO. and Norenberg MD. ATP stimulates calcium influx in primary astrocyte cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* 157(3): 1410-6; 1988.
- Neary JT, Zhu Q, Kang Y, Dash PK. Extracellular ATP induces formation of AP-1 complexes in astrocytes via P2 purinoceptors. *Neuroreport.* 7: 2893-6; 1996.
- Neary JT. and Zhu Q. Signaling by ATP receptors in astrocytes. *Neuroreport.* 5(13):1617-20; 1994.
- Neri Serneri G., Masotti G., Poggesi L., Galanti G., Morettini A. Enhanced prostacyclin production by dipyridamole in man. *Eur J Pharmacol.* 21:9-15. 1981.
- Newell D.R., O'Connor P.M., Calvert A.H., Karap K.R. The effect of the nucleoside transport inhibitor dipyridamole on the incorporation of [3H]thymidine in the rat. *Biochem Pharmacol.* 35 (21):3871-7. 1986.
- Nicke A, Bäumer HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17: 3016-28; 1998.
- Nishino T. and Tamura I. The mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *Adv. Exp. Med. Biol.* 309^a: 327–333; 1991.
- Nita D.A., Nita V., Spulber S., Moldovan M., Popa D.P., Zagrean A.M. and Zagrean L. Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion—A biochemical study in rat. *J. Cell. Mol. Med.* 5: 163–170, 2001.
- Nonaka H, Ichimura M, Takeda M, Nonaka Y, Shimada J, Suzuki F, Yamaguchi K, Kase H. KF17837 ((E)-8-(3,4-dimethoxystyryl)-1,3-dipropyl-7-methylxanthine), a potent and selective adenosine A2 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol.* 267: 335-341, 1994.
- Nordstedt C. and Fredholm B.B. Phorbol-12,13-dibutyrate enhances the cyclic AMP accumulation in rat hippocampal slices induced by adenosine analogues. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 335: 136-142, 1987.
- Nörenberg W, Illes P. Neuronal P2X receptors: localisation and functional properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362: 324-39; 2000.
- North RA. P2X receptors: a third major class of ligand-gated ion channels. *Ciba Found Symp.* 198: 91-105; discussion 105-9; 1996.
- Noshita N., Sugawara T., Fujimura M., Morita-Fujimura, Y. and Chan P.H. Manganese superoxide dismutase affects cytochrome C release and caspase-9 activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21: 557–567, 2001.
- Nozaki K., Nishimura M. and Hashimoto N. Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia. *Mol. Neurobiol.* 23: 1–19, 2001.

- Nuttall LC, el-Moatassim C, Dubyak GR. Expression of the pore-forming P2Z purinoreceptor in *Xenopus* oocytes injected with poly(A)⁺ RNA from murine macrophages. *Mol Pharmacol*. 44: 93-101; 1993.
- O'Regan M.H., Simpson R.E., Perkins L.M. and Phillis J.W. The selective A₂ adenosine receptor agonist CGS 21680 enhances excitatory transmitter amino acid release from the ischemic rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett*. 138: 169-172, 1992.
- O'Connor SE, Dainty IA, Leff P. Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends Pharmacol Sci*. 12: 137-41; 1991.
- Odano, I. *et al.* A potential use of a ¹²³I-labelled benzodiazepine receptor antagonist as a predictor of neuronal cell viability: comparisons with ¹⁴C-labelled 2-deoxyglucose autoradiography and histopathological examination. *Nucl Med Commun*. 16: 443-446; 1995.
- Ohisalo J.J. Regulatory functions of adenosine. *Med Biol*. 65: 181-191. 1987
- Ohsawa K. and Uchizono K. New fractionation method of synaptic vesicles in the brain. *Proc. Japan Acad*. 51: 202-207; 1975.
- Ohta H., Nishikawa H., Kimura H., Anayama H. and Miyamoto M. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience*. 79: 1039-50. 1997.
- Ohta K., Graf R., Rosner G. and Heiss W.D. Calcium ion transients in peri-infarct depolarizations may deteriorate ion homeostasis and expand infarction in focal cerebral ischemia in cats. *Stroke* 32: 535-543, 2001.
- Okada Y. and Kuroda Y. Inhibitory action of adenosine and adenosine analogs on neurotransmission in the olfactory cortex slice of guinea pig - structure-activity relationships. *Eur. J. Pharmacol*. 61: 137-146; 1980.
- Okada Y. and Ozawa S. Inhibitory action of adenosine on synaptic transmission in the hippocampus of the guinea pig in vitro. 68: 483-492; 1980.
- Okada Y., Copeland B.R., Mori E., Tung M.M., Thomas W.S. and del Zoppo G.J. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke* 25: 202-211, 1994.
- Olah M. E. and Stiles G. L. The role of receptor structure in determining adenosine receptor activity. *Pharmacol. Ther*. 85: 55-75; 2000.
- Oldendorf W.H. "Trophic changes in the arteries at the base of the brain in response to bilateral common carotid ligation." *J Neuropathol Exp Neurol*. 48: 534-47. 1989.
- Ongini E., Adami M., Ferri C. and Bertorelli R. Adenosine A_{2A} receptors and neuroprotection. *Ann. NY Acad. Sci*. 825: 30-48, 1997.
- Otori T., Katsumata T., Muramatsu H., Kashiwagi F., Katayama Y., Terashi A. Long-term measurements of cerebral blood flow and metabolism in a rat chronic hypoperfusion model. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 30:266-72. 2003.
- Pajski M.L. and Venton B.J. Adenosine Release Evoked by Short Electrical Stimulations in Striatal Brain Slices is Primarily Activity Dependent. *ACS Chem Neurosci*. 1: 775-787; 2010.
- Palmer T. M., Poucher S. M., Jacobson K. A. and Stiles G. L. ¹²⁵I-4-(2-[7-Amino-2-furyl]{1,2,4}tri-azolo{2,3-a}{1,3,5}triazin-5-ylaminoethyl)phenol (¹²⁵I-ZM241385), a high affinity antagonist radioligand selective for the A_{2A} adenosine receptor. *Mol. Pharmacol*. 48: 970-974; 1996.

- Pankratov Y, Castro E, Miras-Portugal MT, Krishtal O. A purinergic component of the excitatory postsynaptic current mediated by P2X receptors in the CA1 neurons of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 10: 3898-902; 1998.
- Pappas B.A., De la Torre J.C., Davidson C.M., Keyes M.T., Fortin T. Chronic reduction of cerebral blood flow in the adult rat: late-emerging CA1 cell loss and memory dysfunction. *Brain Res*. 708: 50-8. 1996
- Parthasarathy S., Steinberg D., Witztum J.L. The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Ann Rev Med*. 43: 219-25. 1992.
- Patel A., Craig R. H., Daluge S. M., and Linden J. 125I-BW-A844U, an antagonist radioligand with high affinity and selectivity for adenosine A1 receptors, and 125I-azido-BW-A844U, a photoaffinity label. 33: 585-591; 1988.
- Paxinos G. and Watson G., 1982. The rat brain in stereo-taxic coordinates. Academic Press, New York.
- Pazzagli M, Pedata F, Pepeu G. Effect of K⁺ depolarization, tetrodotoxin, and NMDA receptor inhibition on extracellular adenosine levels in rat striatum. *Eur J Pharmacol*. 234: 61-5; 1993.
- Peakman M. C. and Hill S. J. Adenosine A_{2B}-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. *Br. J. Pharmacol*. 111. 191-198; 1994.
- Pedata F, Corsi C, Melani A, Bordoni F, Latini S: Adenosine extracellular brain concentrations and role of A2A receptors in ischemia. *Ann NY Acad Sci* 2001, 939:74-84, 2001.
- Pedata F, Gianfriddo M, Turchi D, Melani A: The protective effect of adenosine A2A receptor antagonism in cerebral ischemia. *Neurol Res* 27:169-174, 2005.
- Pedata F, Melani A, Pugliese AM, Coppi E, Cipriani S, Traini C: The role of ATP and adenosine in the brain under normoxic and ischemic conditions. *Purinergic Signal* 3:299-310, 2007.
- Pedata F, Pugliese AM, Corti F, Melani A: Adenosine and Stroke. In *Adenosine: a Key Link between Metabolism and CNS Activity*. Edited by Masino S and Boison D. New York: Springer; 2012.
- Pedata F, Pugliese AM, Melani A, Gianfriddo M: A2A receptors in neuroprotection of dopaminergic neurons [abstract]. *Neurology* 2003, 61:s49-50, 2003.
- Pedata F., Antonelli T., Lambertini L., Beani L. and Pepeu G. Effect of adenosine, adenosine triphosphate, adenosine deaminase, dipyrindamole and aminophylline on acetylcholine release from electrically stimulated brain slices. *Neuropharmacology*. 22: 609-614; 1983.
- Pedata F., Latini S., Pugliese A.M. and Pepeu G. Investigations into the adenosine outflow from hippocampal slices evoked by ischemia-like conditions. *J Neurochem*. 61: 281-289, 1993.
- Pedata F., Pazzagli M. and Pepeu G. Endogenous adenosine release from hippocampal slices: excitatory amino acid agonists stimulate release, antagonists reduce the electrically-evoked release. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 344: 538-543, 1991.
- Pedata, F. *et al.* The protective effect of adenosine A2A receptor antagonism in cerebral ischemia. *Neurol Res*. 27: 169-174; 2005.
- Pedata, F., Magnani, M., and Pepeu, G. Muscarinic modulation of purine release from electrically stimulated rat cortical slices. 50: 1074-1079; 1988.

- Pedata, F., Pepeu, G., and Spignoli, G. Biphasic effect of methylxanthines on acetylcholine release from electrically-stimulated brain slices. 83: 69-73; 1984.
- Pei Z., Pang S.F. and Cheung R.T. Administration of melatonin after onset of ischemia reduces the volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *Stroke* 34: 770-775, 2003.
- Pei Z., Pang S.F. and Cheung R.T. Pretreatment with melatonin reduces volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J. Pineal Res.* 32: 168-172, 2002.
- Petito C.K., Feldmann E., Pulsinelli W.A., Plum F. Delayed hippocampal damage in humans following cardiorespiratory arrest. *Neurology*. 37: 1281-6. 1987.
- Phillis J.W., Edstrom J.P., Kostopoulos G.K. and Kirkpatrick J.R. Effects of adenosine and adenine nucleotides on synaptic transmission in the cerebral cortex. *Can J Physiol Pharmacol.* 57: 1289-1312, 1979.
- Phillis J.W., O'Regan M.H. and Walter G.A. Effects of two nucleoside transport inhibitors, dipyridamole and solufazine, on purine release from the rat cerebral cortex. *Brain Res.* 481: 309-316; 1989.
- Phillis, J.W., O'Regan, M.H., and Perkins, L.M. Effect of adenosine receptor agonists on spontaneous and K(+)-evoked acetylcholine release from the in vivo rat cerebral cortex. 605: 293-297; 1993.
- Picano E. and Jagathesan R. The beneficial effects of long-term chronic oral dipyridamole therapy on coronary vasodilator reserve in patients with chronic stable angina: the PISA (Persantin in Stable Angina)-PET study. *Circulation*. 102: 707. 2000.
- Picano E. Dipyridamole-echocardiography test: historical background and physiologic basis. *Eur Heart J.* 10: 365-76. 1989.
- Picano E., Michelassi C. Chronic oral dipyridamole as a novel antianginal drug: the collateral hypothesis. *Cardiovasc Res.* 33: 666-70. 1997.
- Pintor A, Galluzzo M, Grieco R, Pezzola A, Reggio R, Popoli P: Adenosine A2A receptor antagonists prevent the increase in striatal glutamate levels induced by glutamate uptake inhibitors. *J Neurochem* 89:152-156; 2004.
- Pintor J, Díaz-Rey MA, Miras-Portugal MT. Ap4A and ADP-beta-S binding to P2 purinoceptors present on rat brain synaptic terminals. *Br J Pharmacol.* 108: 1094-9; 1993.
- Pintor J, Rotllán P, Torres M, Miras-Portugal MT. Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. *Anal Biochem.* 200: 296-300; 1992.
- Pintor J. and Miras-Portugal MT. A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes. *Br J Pharmacol.* 115: 895-902; 1995.
- Plaschke, K. *et al.* Interrelation between cerebral energy metabolism and behaviour in a rat model of permanent brain vessel occlusion. *Brain Res.* 830: 320-329; 1999.
- Plesner L. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol.* 158: 141-214; 1995.
- Popoli P, Giménez-Llort L, Pezzola A, Reggio R, Martínez E, Fuxe K. and Ferré S. Adenosine A1 receptor blockade selectively potentiates the motor effects induced by dopamine D1 receptor stimulation in rodents. *Neurosci Lett.* 218: 209-213, 1996.

- Popoli P, Pintor A, Domenici MR, Frank C, Tebano MT, Pèzzola A, Scarchilli L, Quarta D, Reggio R, Malchiodi-Albedi F, Falchi M, Massotti M. Blockade of striatal adenosine A2A receptor reduces, through a presynaptic mechanism, quinolinic acid-induced excitotoxicity: possible relevance to neuroprotective interventions in neurodegenerative diseases of the striatum. *J Neurosci.* 22: 1967-75; 2002.
- Popoli P., Betto P., Reggio R. and Ricciarello G. Adenosine A2A receptor stimulation enhances striatal extracellular glutamate levels in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 287: 215–217, 1995.
- Pugliese A.M., Coppi E., Spalluto G., Corradetti R. and Pedata F. A3 adenosine receptor antagonists delay irreversible synaptic failure caused by oxygen and glucose deprivation in the rat CA1 hippocampus in vitro. *Br J Pharmacol.* 147: 524-532, 2006.
- Pugliese A.M., Latini S., Corradetti R. and Pedata F. Brief, repeated, oxygen-glucose deprivation episodes protect neurotransmission from a longer ischemic episode in the in vitro hippocampus: role of adenosine receptors. *Br J Pharmacol.* 140: 305-314, 2003.
- Pulsinelli W.A. and Briesley J.B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke.* 10:267-72. 1979.
- Radford KM, Virginio C, Surprenant A, North RA. and Kawashima E. Baculovirus expression provides direct evidence for heteromeric assembly of P2X2 and P2X3 receptors. *J Neurosci.* 17: 6529-33; 1997.
- Ralevic V. and Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 50: 413-92; 1998.
- Ralevic V., Hoyle CH. and Burnstock G. Pivotal role of phosphate chain length in vasoconstrictor versus vasodilator actions of adenine dinucleotides in rat mesenteric arteries. *J Physiol.* 483: 703-13; 1995.
- Rathmell J.C. and Thompson C.B. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 781–828, 1999.
- Reigada D, Díez-Pérez I, Gorostiza P, Verdaguer A, Gómez de Aranda I, Pineda O, Vilarrasa J, Marsal J, Blasi J, Aleu J, Solsona C. Control of neurotransmitter release by an internal gel matrix in synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 3485-90; 2003.
- Reisin IL, Prat AG, Abraham EH, Amara JF, Gregory RJ, Ausiello DA. and Cantiello HF. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem.* 269: 20584-91; 1994.
- Reppert S. M., Weaver D. R., Stehle J. H., and Rivkees S. A. Molecular cloning and characterization of a rat A1-adenosine receptor that is widely expressed in brain and spinal cord. 5, 1037-1048; 1991.
- Rhule JT, Hill CL, Judd DA, Schinazi RF. Polyoxometalates in Medicine. *Chem Rev.* 98: 327-358; 1998.
- Ribeiro J.A., Sebastiao A.M. and de Mendonca A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.* 68: 377–392, 2002.
- Riksen N.P., et al. “Oral therapy with dipyridamole limits ischemia-reperfusion injury in humans.” *Clin Pharmacol Ther.* 78:52-9. 2005.
- Ritchie L.J., Debutte M., Pappas B.A. Chronic mild stress exacerbates the effects of permanent bilateral common carotid artery occlusion on CA1 neurons. *Brain Res.* 1014: 228-35. 2004

- Rivo J., Zeira E., Galun E. and Matot I. Activation of A₃ adenosine receptor provides lung protection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis. *Am. J. Transplant.* 4: 1941–1948; 2004.
- Romanello M, Codognotto A, Bicego M, Pines A, Tell G, D'Andrea P. Autocrine/paracrine stimulation of purinergic receptors in osteoblasts: contribution of vesicular ATP release. *Biochem Biophys Res Commun.* 331: 1429-38; 2005.
- Roof, R.L. *et al.* A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke.* 32: 2648–2657; 2001.
- Rosin D.L., Robeva A., Woodard R.L., Guyenet P.G. and Linden J. Immunohistochemical localization of adenosine A_{2A} receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol.* 401: 163-186, 1998.
- Rudolphi K.A., Schubert P., Parkinson F.E. and fredholm B.B. Adenosine and brain ischemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 4: 346-369, 1992.
- Sairanen T., Carpen O., Karjalainen-Lindsberg M.L., Paetau A., Turpeinen U., Kaste M. and Lindsberg P.J. Evolution of cerebral tumor necrosis factor- α production during human ischemic stroke. *Stroke* 32: 1750–1758, 2001.
- Saito A., Hayashi T., Okuno S., Nishi T. and Chan P.H. Modulation of the Omi/HtrA2 signaling pathway after transient focal cerebral ischemia in mouse brains that overexpress SOD1. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 127: 89–95, 2004.
- Salter MW. and Hicks JL. ATP causes release of intracellular Ca²⁺ via the phospholipase C beta/IP3 pathway in astrocytes from the dorsal spinal cord. *J Neurosci.* 15: 2961-71; 1995.
- Sanchez-Moreno C., Dashe J.F., Scott T., Thaler D., Folstein M.F. and Martin A. Decreased levels of plasma vitamin C and increased concentrations of inflammatory and oxidative stress markers after stroke. *Stroke* 35: 163–168, 2004.
- Sanz JM, Di Virgilio F. Kinetics and mechanism of ATP-dependent IL-1 beta release from microglial cells. *J Immunol.* 164: 4893-8; 2000.
- Sarges R, Howard HR, Browne RG, Lebel LA, Seymour PA. and Koe B.K. 4-Amino[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalines. A novel class of potent adenosine receptor antagonists and potential rapid-onset antidepressants. *J Med Chem.* 33: 2240-2254, 1990.
- Sarti C., Pantoni L., Bartolini L. and Inzitari D. Persistent impairment of gait performances and working memory after bilateral common carotid artery occlusion in the adult Wistar rat. *Behav Brain Res.* 136: 13-20. 2002B
- Sarti C., Pantoni L., Bartolini L., Inzitari D. Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models. *J Neurol Sci.* 204: 263-6. 2002A
- Sattin, A. and Rall, T. W. The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3', 5'-phosphate content of guinea pig cerebral cortex slices. 6: 13-23; 1970.
- Schilling, M. *et al.* Effects of monocyte chemoattractant protein 1 on blood-borne cell recruitment after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience.* 161: 806-812; 2009.
- Schmidt-Kastner R., Truettner J., lin B., Zhao W., Saul I., Busto R., Ginsberg M.D. Transient changes of BDNF mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusion in the rat. *Brain Res Mol.* 92: 157-66. 2001.

- Schoen SW, Kreutzberg GW. 5'-nucleotidase enzyme cytochemistry as a tool for revealing activated glial cells and malleable synapses in CNS development and regeneration. *Brain Res Brain Res Protoc.* 1: 33-43; 1997.
- Scholz K.P. and Miller R.J. Analysis of adenosine actions on Ca²⁺ currents and synaptic transmission in cultured rat hippocampal pyramidal neurons. *J Physiol.* 435: 373-393, 1991.
- Schulte G. and Fredholm B. B. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal.* 15, 813–827; 2003.
- Schwarzschild M.A., Chen J.F. and Ascherio A. Caffeinated clues and the promise of adenosine A_(2A) antagonists in PD. *Neurology* 58: 1154–1160, 2002.
- Schwencke C, Yamamoto M, Okumura S, Toya Y, Kim SJ, Ishikawa Y. Compartmentation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling in caveolae. *Mol Endocrinol.* 13: 1061-70; 1999.
- Seifert R, Schultz G. Involvement of pyrimidinoceptors in the regulation of cell functions by uridine and by uracil nucleotides. *Trends Pharmacol Sci.* 10: 365-9; 1989.
- Selyanko AA. and Brown DA. Regulation of M-type potassium channels in mammalian sympathetic neurons: action of intracellular calcium on single channel currents. *Neuropharmacology.* 35: 933-47; 1996.
- Sesti C, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Marcus AJ, Levi R. EctoNucleotidase in cardiac sympathetic nerve endings modulates ATP-mediated feedback of norepinephrine release. *J Pharmacol Exp Ther.* 300: 605-11; 2002.
- Shigeno T., Mc Culloch J., Graham D.I., Mendelow A.D., Teasdale G.M. Pure cortical ischemia vs striatal ischemia. Circulatory, metabolic and neuropathologic consequences. *Surg Neurol.* 1: 47-51. 1985.
- Shinozuka K, Bjur RA, Westfall DP. Characterization of prejunctional purinoceptors on adrenergic nerves of the rat caudal artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 338: 221-227; 1988.
- Shneyvays V., Leshem D., Zinman T., Mamedova L.K., Jacobson K.A. and Shainberg A. Role of adenosine A₁ and A₃ receptors in regulation of cardiomyocyte homeostasis after mitochondrial respiratory chain injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288: H2792–H2801, 2005.
- Shneyvays V., Zinman T. and Shainberg A. Analysis of calcium responses mediated by the A₃ adenosine receptor in cultured newborn rat cardiac myocytes. *Cell Calcium* 36: 387–396; 2004.
- Shyu K.G., Chang H. and Lin C.C. Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute ischemic stroke. *J. Neurol.* 244: 90–93, 1997.
- Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215: 213–219, 1993.
- Simpson R.E., O'Regan M.H., Perkins L.M. and Phillis J.W. Excitatory transmitter amino acid release from the ischemic rat cerebral cortex: effects of adenosine receptor agonists and antagonists. *J. Neurochem.* 58: 1683–1690, 1992.
- Smith FM, Humphrey PP, Murrell-Lagnado RD. Identification of amino acids within the P2X₂ receptor C-terminus that regulate desensitization. *J Physiol.* 520 Pt 1: 91-9; 1999.
- Smith M.L., Berdek G., Dahlgren N., Rosen J., Wieloch T., Siesjö B.K. Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat: a 2 vessel occlusion model. *Acta Neurol.* 69: 385-401. 1984.

- Smith TM, Kirley TL. Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases1. *Biochim Biophys Acta*. 1386: 65-78; 1998.
- Smith TM, Kirley TL. Glycosylation is essential for functional expression of a human brain ecto-apyrase. *Biochemistry*. 38: 1509-16; 1999.
- Soltoff SP, McMillian MK, Talamo BR. ATP activates a cation-permeable pathway in rat parotid acinar cells. *Am J Physiol*. 262(4 Pt 1):C934-40; 1992.
- Sorensen CE, Novak I. Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus. Use of fluorescent probes and confocal microscopy. *J Biol Chem*. 276: 32925-32; 2001.
- Sperlágh B, András I. and Vizi S. Effect of subtype-specific Ca(2+)-antagonists and Ca(2+)-free media on the field stimulation-evoked release of **ATP** and [3H]acetylcholine from rat habenula slices. *Neurochem Res*. 22: 967-75; 1997.
- Sperlágh B, Köfalvi A, Deuchars J, Atkinson L, Milligan CJ, Buckley NJ, Vizi ES. Involvement of P2X7 receptors in the regulation of neurotransmitter release in the rat hippocampus. *J Neurochem*. 81: 1196-211; 2002.
- Stadler H, Fenwick EM. Cholinergic synaptic vesicles from *Torpedo marmorata* contain an atractyloside-binding protein related to the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Eur J Biochem*. 136: 377-82; 1983.
- Stanimirovic D. and Satoh K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol* 10: 113–126, 2000.
- Stevens B., Porta S., Haak L.L., Gallo V. and Fields R.D. Adenosine: a neuron-glial transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron*. 36: 855–868, 2002.
- Stevens S.L., Bao J., Hollis J., Lessov N.S., Clark W.M. and Stenzel-Poore M.P. The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 932: 110–119, 2002.
- Stjärne L, Stjärne E. Geometry, kinetics and plasticity of release and clearance of ATP and noradrenaline as sympathetic cotransmitters: roles for the neurogenic contraction. *Prog Neurobiol*. 47: 45-94; 1995.
- Stjärne L. Novel dual 'small' vesicle model of ATP- and noradrenaline-mediated sympathetic neuromuscular transmission. *Auton Neurosci*. 87: 16-36; 2001.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M: Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol* 56:149-171, 1998.
- Stoop R, Thomas S, Rassendren F, Kawashima E, Buell G, Surprenant A, North RA. Contribution of individual subunits to the multimeric P2X(2) receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. *Mol Pharmacol*. 56: 973-81; 1999.
- Stout CE, Costantin JL, Naus CC, Charles AC. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem*. 277:10482-8; 2002.
- Stout JG. and Kirley TL. Inhibition of purified chicken gizzard smooth muscle ecto-ATPase by P2 purinoceptor antagonists. *Biochem Mol Biol Int*. 36: 927-34; 1995.
- Suadicani SO, Brosnan CF, Scemes E. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J Neurosci*. 26:1378-85; 2006.

- Sugawara T., Noshita N., Lewen A., Gasche Y., Ferrand-Drake M., Fujimura M., Morita-Fujimura Y. and Chan P.H. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J. Neurosci.* 22: 209–217, 2002.
- Sughrue M.E., Mehra A., Connolly E.S. Jr and D'Ambrosio A.L. Anti-adhesion molecule strategies as potential neuroprotective agents in cerebral ischemia: a critical review of the literature. *Inflamm Res* 53: 497–508, 2004.
- Sugino T., Nozaki K. and Hashimoto N. Activation of mitogen-activated protein kinases in gerbil hippocampus with ischemic tolerance induced by 3-nitropropionic acid. *Neurosci. Lett.* 278: 101–104, 2000.
- Suh BC. and Hille B. Recovery from muscarinic modulation of M current channels requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis. *Neuron.* 35: 507-20; 2002.
- Sullivan GW. Adenosine a2A receptors agonists as anti-inflammatory agents. *Curr Opin Investig Drugs* 4: 1313-1319, 2003.
- Surprenant A, Buell G, North RA. P2X receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. *Trends Neurosci.* 18: 224-229; 1995.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science.* 272:735-738; 1996.
- Suzuki K., Miura T., Miki T., Tsuchida A., Shimamoto K. Infarct size limitation by preconditioning is enhanced by dipyridamole administered before but not after preconditioning. Evidence for the role of interstitial adenosine level during preconditioning as a primary determinant of cardioprotection. *J Cardiovasc Pharmacol.* 31:1-9. 1998.
- Sweeney M.I. Adenosine release and uptake in cerebellar granule neurons both occur via an equilibrative nucleoside carrier that is modulated by G proteins. *J. Neurochem.* 67, 81-88; 1996.
- Tamura A., Graham D.I., Mc Culloch J., Teasdale G.M. Focal cerebral ischemia in the rat: description of technique and early neuropathological consequences following MCAo. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1:53-60. 1981.
- Tan D.X., Manchester L.C., Reiter R.J., Qi W.B., Karbownik M., Calvo J.R. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol. Signals Recept.* 9: 137–159, 2000.
- Taniguchi M., et al. Dipyridamole protects the liver against warm ischemia and reperfusion injury. *J Am Coll Surg.* 198:758-69, 2004.
- Thorn J.A. and Jarvis S.M. Adenosine transporters. *Gen. Pharmacol.* 27, 613-620; 1996.
- Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Westfall TD, Sneddon P, Kennedy C, Bjur RA, Westfall DP. Neuronal release of soluble nucleotidases and their role in neurotransmitter inactivation. *Nature.* 387: 76-9; 1997.
- Tokumura A, Tominaga K, Yasuda K, Kanzaki H, Kogure K, Fukuzawa K. Lack of significant differences in the corrected activity of lysophospholipase D, producer of phospholipid mediator lysophosphatidic acid, in incubated serum from women with and without ovarian tumors. *Cancer.* 94: 141-51; 2002.
- Tomimoto H., Ihara M., Wakita H., Ohtani R., Lin J.X., Akiguchi I., Kinoshita M., Shibasaki H. Chronic cerebral hypoperfusion induces white matter lesions and loss of oligodendroglia with DNA fragmentation in the rat. *Acta Neuropathol.* 106:527-43. 2003.

- Torres GE, Egan TM, Voigt MM. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem.* 274: 6653-9; 1999.
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM. N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry.* 37:14845-51; 1998b.
- Torres GE, Haines WR, Egan TM, Voigt MM. Co-expression of P2X1 and P2X5 receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol Pharmacol.* 54: 989-93; 1998a
- Trincavelli M.L., Melani A., Guidi S., Cuboni S., Cipriani S., Pedata F. and Martini C. Regulation of A(2A) adenosine receptor expression and functioning following permanent focal ischemia in rat brain. *J Neurochem.* 104: 479-90; 2008.
- Trussell L.O. and Jackson M.B. Adenosine-activated potassium conductance in cultured striatal neurons. 82: 4857-4861, 1985.
- Tsuchiya M., Sako K., Yura S., Yonemasu Y. Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats. *Exp Brain Res.* 89:87-92. 1992.
- Ueda N., Kawaguchi S., Niiomi Y., et al. Effect of dipyridamole treatment on proteinuria in pediatric renal disease. *Nephron.* 44: 174-9. 1986.
- Ulrich PT., Kroppenstedt S., Heimann A., Kempfski O. Laser-Doppler scanning of local cerebral blood flow and reserve capacity and testing of motor and memory functions in a chronic 2-vessel occlusion model in rats. *Stroke.* 29: 2412-20. 1998.
- Usune S., Katsuragi T. and Furukawa T. Effects of PPADS and suramin on contractions and cytoplasmic Ca²⁺ changes evoked by AP4A, ATP and alpha, beta-methylene ATP in guinea-pig urinary bladder. *Br J Pharmacol.* 117: 698-702; 1996.
- Uvnäs B. The isolation of secretory granules from mast cells. *Methods Enzymol.* 31:395-402; 1974.
- Valdés R., Ortega M.A., Casado F.J., Felipe A., Gil A., Sánchez-Pozo A. and Pastor-Anglada M. Nutritional regulation of nucleoside transporter expression in rat small intestine. *Gastroenterology.* 119: 1623-30; 2000.
- Van Calker D., Muller M. and Hamprecht B. Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature.* 276: 839-841, 1978.
- Van der Kloot W. Loading and recycling of synaptic vesicles in the Torpedo electric organ and the vertebrate neuromuscular junction. *Prog Neurobiol.* 71: 269-303; 2003
- Van Rhee AM, Fischer B, Van Galen PJ, Jacobson KA. Modelling the P2Y purinoceptor using rhodopsin as template. *Drug Des Discov.* 13: 133-54; 1995.
- Verderio C. and Matteoli M. ATP mediates calcium signaling between astrocytes and microglial cells: modulation by IFN-gamma. *J Immunol.* 166(10):6383-91; 2001.
- Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology.* 36: 1285-94; 1997.
- von Kügelgen I, Schöffel E. and Starke K. Inhibition by nucleotides acting at presynaptic P2-receptors of sympathetic neuro-effector transmission in the mouse isolated vas deferens. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 340: 522-32. 1989.
- von Kügelgen I. and Wetter A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362: 310-23; 2000.

- Von Lubitz D.K. Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept?, *Eur. J. Pharmacol.* 365: 9–25, 1999.
- Von Lubitz D.K., Lin R.C., Popik P., Carter M.F. and Jacobson K.A. Adenosine A3 receptor stimulation and cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol.* 263: 59-67, 1994b.
- Von Lubitz DK, Lin RC, Melman N, Ji XD, Carter MF, Jacobson KA. Chronic administration of selective adenosine A1 receptor agonist or antagonist in cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol.* 256: 161-167, 1994a
- Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Stone LS, Hargreaves KM, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R. P2X3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II. *Eur J Neurosci.* 10: 3470-8; 1998.
- Vulchanova L., Arvidsson U., Riedl M., Wang J., Buell G., Surprenant A., North R.A. and Elde R. Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:8063-7; 1996.
- Wall M.J. and Dale N. Auto-inhibition of rat parallel fibre-Purkinje cell synapses by activity-dependent adenosine release. *J Physiol.* 581(Pt 2): 553-65; 2007.
- Wang TF. and Guidotti G. CD39 is an ecto-(Ca²⁺,Mg²⁺)-apyrase. *J Biol Chem.* 271:9898-901; 1996.
- Wang TF. and Guidotti G. Golgi localization and functional expression of human uridine diphosphatase. *J Biol Chem.* 273: 11392-9; 1998.
- Webb TE, Henderson D, King BF, Wang S, Simon J, Bateson AN, Burnstock G. and Barnard EA. A novel G protein-coupled P2 purinoceptor (P2Y3) activated preferentially by nucleoside diphosphates. *Mol Pharmacol.* 50: 258-65; 1996.
- Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, Barnard EA. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* 324: 219-25; 1993.
- Weinstock, M. and Shoham S. Rat models of dementia based on reductions in regional glucose metabolism, cerebral blood flow and cytochrome oxidase activity. *J Neural Transm.* 111: 347-366; 2004.
- Wen J., Watanabe K., Ma M., Yamaguchi K., Tachikawa H., Kodama M. and Aizawa Y. Edaravone inhibits JNK-c-Jun pathway and restores anti-oxidative defense after ischemia–reperfusion injury in aged rats. *Biol. Pharm. Bull.* 29: 713–718, 2006
- Werner P., Seward E.P., Buell G.N. and North R.A. Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 15485-90; 1996.
- Weyrich A.S., Denis M.M., Kuhlmann Eyre J.R., et al. Dipyridamole selectively inhibits inflammatory gene expression in platelet-monocyte aggregates. *Circulation.* 111: 633-42. 2005.
- Weyrich, A.S. et al. Dipyridamole selectively inhibits inflammatory gene expression in platelet-monocyte aggregates. *Circulation.* 111: 633-642; 2005.
- White TD. Characteristics of neuronal release of ATP. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 8: 487-93; 1984.
- White TD. Release of ATP from a synaptosomal preparation by elevated extracellular K⁺ and by veratridine. *J Neurochem.* 30:329-36; 1978.

- Wiedenmann B. and Franke W.W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41: 1017-1028; 1985.
- Wieraszko A. and Ehrlich YH. On the role of extracellular ATP in the induction of long-term potentiation in the hippocampus. *J Neurochem.* 1994 Nov;63(5):1731-8.
- Wiklund NP. and Gustafsson LE. Indications for P2-purinoceptor subtypes in guinea pig smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1988 Apr 13;148(3):361-70.
- Wirkner K, Köles L, Thümmel S, Luthardt J, Poelchen W, Franke H, Fürst S. and Illes P. Interaction between P2Y and NMDA receptors in layer V pyramidal neurons of the rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology.* 42: 476-88; 2002.
- Wood PL. Microglia as a unique cellular target in the treatment of stroke: potential neurotoxic mediators produced by activated microglia. *Neurol Res* 17: 242–248, 1995.
- Wu LG. and Saggau P. Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron.* 12: 1139-1148, 1994.
- Wung B.S., Cheng J.J., Shyue S.K. and Wang D.L. NO modulates monocyte chemotactic protein-1 expression in endothelial cells under cyclic strain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:1941-47. 2001.
- Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R.J. and Greenberg M.E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 270: 1326-1331, 1995.
- Xiang Z., Bo X. and Burnstock G. Localization of ATP-gated P2X receptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia. *Neurosci Lett.* 256(2):105-8; 1998.
- Xiao C. and Ghosh S. NFkB, an evolutionary conserved mediator of immune and inflammatory responses. *Adv Exp Med Biol.* 560:41-5. 2005
- Xu L., Di Q. and Zhang Y. Cell cycle proteins preceded neuronal death after chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Neurol Res.* 30 (9):932-9. 2008
- Yamaguchi, T., M. Suzuki & M. Yamamoto. YM796, a novel muscarinic agonist, improves the impairment of learning behavior in a rat model of chronic focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 669: 107–114; 1995.
- Yang H, Avila MY, Peterson-Yantorno K, Coca-Prados M, Stone RA, Jacobson KA. and Civan MM. The cross-species A₃ adenosine-receptor antagonist MRS 1292 inhibits adenosine-triggered human nonpigmented ciliary epithelial cell fluid release and reduces mouse intraocular pressure. *Curr. Eye Res.* 30, 747–754; 2005.
- Yawo H. and Chuhma N. Preferential inhibition of omega-conotoxin-sensitive presynaptic Ca²⁺ channels by adenosine autoreceptors. *Nature.* 365: 256-258, 1993.
- Yenari M.A., Kunis D., Sun G.H., Onley D., Watson L., Turner S., Whitaker S. and Steinberg G.K. Hu23F2G, an antibody recognizing the leukocyte CD11/CD18 integrin, reduces injury in a rabbit model of transient focal cerebral ischemia. *Exp Neurol* 153: 223–233, 1998.
- Zamponi GW. and Snutch TP. Modulation of voltage-dependent calcium channels by G proteins. *Curr Opin Neurobiol.* 8: 351-6; 1998.
- Zäuner I., Böhrer J., Braun N., et al. “Effect of aspirin and dipyridamole on proteinuria in idiopathic membranoproliferative glomerulonephritis: a multicentre prospective clinical trial.” *Nephron Dial Transplant.* 9:619-22. 1994.

- Zetterström T. and Fillenz M. Adenosine agonists can both inhibit and enhance in vivo striatal dopamine release. *Eur J Pharmacol.* 180: 137-143, 1990.
- Zhang F., Yin W. and Chen J. Apoptosis in cerebral ischemia: executional and regulatory signaling mechanisms. *Neurol Res.* 26: 835-845, 2004.
- Zhang R.L., Chopp M., Zaloga C., Zhang Z.G., Jiang N., Gautam S.C., Tang W.X., Tsang W., Anderson D.C. and Manning A.M. The temporal profiles of ICAM-1 protein and mRNA expression after transient MCA occlusion in the rat. *Brain Res.* 682, 182–188, 1995.
- Zhang Z.G., Zhang L., Tsang W., et al. Dynamic platelet accumulation at the site of occluded middle cerebral artery and in downstream microvessels in associated with loss of microvascular integrity after embolic middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 912:181-94. 2001.
- Zheng Z. and Yenari M.A. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol Res.* 26: 884-892, 2004.
- Zhou Q.Y., Li C., Olah M.E., Johnson R.A., Stiles G.L. and Civelli O. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A₃ adenosine receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89, 7432–7436; 1992.
- Ziganshin AU, Hoyle CH, Ziganshina LE, Burnstock G. Effects of cyclopiazonic acid on contractility and ecto-ATPase activity in guinea-pig urinary bladder and vas deferens. *Br J Pharmacol.* 113: 669-74; 1994.
- Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J.* 285 (Pt 2):345-65; 1992.
- Zimmermann H. and Braun N. Ecto-nucleotidases--molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Prog Brain Res.* 120: 371-85; 1999.
- Zimmermann H. and Denston CR. Adenosine triphosphate in cholinergic vesicles isolated from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *Brain Res.* 111: 365-76; 1976.
- Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362, 299-309; 2000.
- Zimmermann H. Signalling via ATP in the nervous system. *Trends Neurosci.* 17:420-6; 1994.
- Zimmermann H., Volknandt W., Wittich B. and Hausinger A. Synaptic vesicle life cycle and synaptic turnover. *J Physiol Paris.* 87: 159-70; 1993.
- Zola-Morgan S., Squire L.R., Amaral D.W. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci.* 6:2950-67. 1986.

Ringraziamenti

Ringrazio Fabio, i miei genitori, mio fratello e tutte le persone che mi sono state vicine in questi anni di studio. Ringrazio profondamente la Prof.ssa Pedata e la Dott.ssa Alessia Melani che mi sono state accanto nel mio percorso, dalla tesi di laurea e per tutto il dottorato, e che mi hanno seguito con particolare attenzione e pazienza.