

ROBERT KOWALSKI, MACIEJ JANKOWSKI, MIROŚŁAWA SZCZEPAŃSKA-KONKEL

**CHEMILUMINESCENCYJNA METODA OZNACZANIA
STĘŻENIA ADENOZYNY I JEJ METABOLITÓW
W MIKRODIALIZATACH TKANKOWYCH**

**CHEMILUMINESCENT DETERMINATION OF ADENOSINE
AND ITS METABOLITES IN TISSUES MICRODIALYSATES**

Samodzielna Pracownia Terapii Monitorowanej i Farmakogenetyki AM w Gdańsku
kierownik: prof. dr Mirosława Szczepańska-Konkel

Przedmiotem pracy było określenie stężenia adenozyiny w dializatach kory nerek szczura przy użyciu metody chemiluminescencyjnej, częściowo zmodyfikowanej w naszym laboratorium. W otrzymanych dializatach – w wyniku mikroperfuzji kory nerek znieczulonych szczurów – zidentyfikowano czynniki interferujące w oznaczanie adenozyiny, tj. głównie kwas moczowy oraz w mniejszym stopniu inozyna, hipoksantyna i ksantyna. Interferencję kwasu moczowego ograniczono poprzez inkubację próbek z urykazą, enzymem degradującym kwas moczowy do alantoiny. Zastosowanie metody dodawania wzorca umożliwiło określenie adenozyiny w badanych dializatach, w zakresie stężeń od 50 do 400 nmol/l z precyzją określoną przez współczynnik zmienności wynoszący średnio 23%.

Adenozyina jest jednym z czynników regulujących funkcję nerek na drodze autoparakrynej. Pojawiając się w płynie pozakomórkowym nerki hamuje – za pośrednictwem receptorów A_1 – filtrację kłębuszkową, natriurezę i diurezę [3, 5, 6, 8]. Głównym źródłem adenozyiny w płynie pozakomórkowym są komórki będące w stanie deficytu energetycznego, wynikającego z niedotlenienia nerki bądź też nadmiernego obciążenia cewkowego systemu transportu jonu sodowego [10]. Innym źródłem adenozyiny są zakończenia nerwowe włókien purynergicznych i adrenergicznych [2]. Ponadto, adenozyina w płynie pozakomórkowym powstaje w wyniku hydrolizy nukleotydów adeninowych uwalnianych pod wpływem rozciągania komórek lub zmiany osmolalności płynu pozakomórkowego [10]. Z drugiej strony stężenie adenozyiny w płynie pozakomórkowym uwarunkowane jest aktywnością ekto-enzymów metabolizujących adenozyinę do inozyny. Jak wynika z wcześniejszych obserwacji, zmiany stężenia adenozyiny w płynie pozakomórkowym, wywołane dietą o różnej zawartości sodu, zmieniają wrażliwość nerek na działanie ligandów receptorów P1 oraz modyfikują działanie angiotensyny II, ANF oraz czynników farmakologicznych [1]. Doniesienia dotyczące mechanizmu zaburzeń

filtracji kłębuszkowej w doświadczalnie wywołanej cukrzycy sugerują, że czynnikiem odpowiedzialnym, przynajmniej częściowo, może być pozakomórkowa adenozyina [11]. Dlatego też pomiar stężenia adenozyiny w płynie śródmiąższowym nerki w określonych warunkach patofizjologicznych może przyczynić się do bliższego poznania roli pozakomórkowej adenozyiny w patogeniezie pojawiających się zaburzeń funkcji nerek, np. hiperfiltracji w cukrzycy, nadciśnieniu tętniczym.

Ocena stężenia metabolitów w płynie śródmiąższowym różnych narządów najczęściej dokonywana jest w sposób pośredni, w oparciu o pomiar stężenia danego analitu w dializacie, tj. płynie otrzymanym w wyniku mikroperfuzji badanego narządu/tkanki [12]. Spośród metod stosowanych do oznaczania niskich stężeń adenozyiny w objętości płynu ustrojowego rzędu 10^{-5} l oraz dializatach tkankowych/narządowych najczęściej stosowana jest wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa.

W obecnej pracy zastosowano dostępną nam metodę chemiluminescencyjną, która zgodnie z naszą wiedzą, nie była jak do tej pory stosowana do oznaczania adenozyiny w mikrodializatach tkankowych/narządowych. Zasada metody jest oparta na pomiarze luminescencji w czasie, katalizowanej przez peroksydazę, reakcji luminolu z nadtlakiem wodoru, powstającym w wyniku enzymatycznej degradacji adenozyiny do kwasu moczowego [7]. Degradacja adenozyiny do kwasu moczowego jest trój etapowa, w pierwszym etapie powstaje inozyina w obecności deaminazy adenozyiny, w drugim z inozyiny – hipoksantyna w obecności fosforylasy nukleozydowej, a następnie ksantyna i kwas moczowy w obecności oksydazy ksantynowej. Metoda ta po raz pierwszy opisana przez Kather H. i wsp [7], po częściowej modyfikacji w naszym laboratorium, umożliwia oznaczenie adenozyiny w ilości 0,8 pmol w próbce (20 μ l), a także produkty enzymatycznej degradacji adenozyiny, tj. inozyiny, hipoksantyny i ksantyny.

CEL PRACY

Celem pracy było wdrożenie metody chemiluminescencyjnego oznaczania nukleozydów, głównie adenozyiny, w mikrodializatach kory nerek szczura.

MATERIAŁ I METODY

Zwierzęta

Szczury Wistar, samce o ciężarze ciała 200–300 g, pochodziły z hodowli Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, a po ich dostarczeniu do naszego laboratorium, były przetrzymywane w pomieszczeniu o stałej temperaturze (21 °C) i cyklu świetlnym dzień/noc – 12 godz. /12 godz. Okres adaptacji zwierząt do nowych warunków wynosił nie mniej niż 7 dni. W tym czasie zwierzęta były karmione standardową dietą laboratoryjną Labofeed B (Wytwórnia Pasz i Koncentratów, Kcynia) i pojeone do woli wodą wodociągową. Wszystkie procedury badawcze prowadzone były za zgodą Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach Akademii Medycznej w Gdańsku.

Mikrodializa kory nerki

Zwierzę, po uprzednim znieczuleniu tiopentalem (50 mg/kg dootrzewnowo), umieszczano na podgrzewanym stoliku, który umożliwiał utrzymanie temperatury ciała na stałym poziomie (37 °C). Poprzez dojście grzbietowe odsłaniano lewą nerkę a następnie do kory nerki – na głębokość 5 mm – wprowadzano liniową sondę dializacyjną o długości 5 mm, średnicy 0,32 mm, zakończoną po obu stronach drenem polietylenowym (Bio Analytical Systems, West Lafayette, IN, USA). Po założeniu sondy i zaopatrzeniu chirurgicznym rany, jeden koniec drenu podłączono do pompy perfuzyjnej (Bee Hive, Bio Analytical Systems, West Lafayette, IN, USA), a drugi do odbieralnika dializatu. Płyn perfuzyjny o składzie (mmol/l): 145 Na⁺; 4,2 K⁺; 140 Cl⁻; 4,3 HPO₄⁻²; 1,5 H₂PO₄⁻ i pH 7,40 podawano z stałą prędkością 2 µl/min. W okresie wstępnej dializy kory nerek – w pierwszych 60 min – podawano płyn perfuzyjny w celu wypłukania metabolitów uwolnionych z uszkodzonych w czasie zabiegu komórek. Następnie dializę kontynuowano podając kolejno płyn perfuzyjny zawierający adenozyinę o stężeniu: 0, 50, 150, 300 nmol/l, przez okres 45 min dla każdego stężenia adenozyiny. W czasie perfuzji nerki zbierano dializat w 45 minutowych okresach – z zachowaniem 10-minutowej przerwy po każdorazowej zmianie płynu perfuzyjnego. Po zakończeniu doświadczenia znieczulone zwierzę uśmiercano poprzez przecięcie rdzenia kręgowego, a lokalizację sondy dializacyjnej potwierdzano chirurgicznie.

Oznaczenie adenozyiny

Oznaczenie adenozyiny przeprowadzano w oparciu o metodę opisaną przez H. Kather i wsp. [7] z modyfikacją polegającą na enzymatycznej degradacji kwasu moczowego – czynnika interferującego w luminometryczne oznaczenie nukleozydów w płynach biologicznych [4]. Dializaty tkankowe, podobnie jak płyn śródmiąższowy, osocze i mocz, zawierają kwas moczowy oraz inozyinę, hipoksantynę i ksantynę. Dlatego też do kalibracji metody stosowano standardowe roztwory adenozyiny oraz inozyiny, hipoksantyny i kwasu moczowego w stężeniach zbliżonych do płynu międzykomórkowego.

Standardowe roztwory nukleozydów

Roztwory adenozyiny (ADO): 50, 100, 150, 200, 300 i 400 nmol/l sporządzano przez odpowiednie rozcieńczenie przygotowanych wcześniej, zamrożonych roztworów macierzystych ADO o stężeniu 10 mmol/l. Do rozcieńczenia używano PBS o pH 7,40 (skład przedstawiono poniżej).

Roztwory adenozyiny (jak wyżej) z dodatkiem inozyiny (INO; 50 nmol/l), hipoksantyny (HYP; 200 nmol/l). Macierzyste roztwory INO i HYP (10 mmol/l każdy) przechowywano w temperaturze -20 °C.

Roztwory adenozyiny z dodatkiem INO i HYP (jak wyżej) oraz kwasu moczowego (UA; 200 µmol/l). Macierzysty roztwór UA (10 mmol/l) w roztworze węglanu litu (36 mmol/l).

Odczynniki

Wieloelektrolitowy roztwór buforowany fosforanami (PBS) o pH 7,40 i składzie (mmol/l): 145 Na⁺; 4,2 K⁺; 140 Cl⁻; 4,3 HPO₄⁻²; 1,5 H₂PO₄⁻.

Bufor fosforanowy: 200 mmol/l Na_2HPO_4 / KH_2PO_4 , pH 8,2.

Reagent I: Bufor fosforanowy zawierający enzymy (U/ml): urykazę (0,17) i peroksydazę (100)

Reagent II: Roztwór luminolu (25 $\mu\text{mol/l}$) w buforze fosforanowym z dodatkiem EDTA (2,5 mmol/l) oraz zawierający enzymy (U/ml): fosforylaze nukleozydową (0,05), oksydazę ksantynową (0,07) i peroksydazę (1,5).

Reagent III: Roztwór luminolu w buforze fosforanowym z dodatkiem EDTA (skład jak wyżej) zawierający enzymy (U/ml): deaminazę adenozyiny (2,4); fosforylaze nukleozydową (0,05); oksydazę ksantynową (0,04); peroksydazę (1,5).

Użyte do doświadczeń enzymy i związki purynowe pochodziły z następujących źródeł: Sigma-Aldrich Sp. z o.o. – urykaza (EC 1.7.3.3), fosforylaza nukleozydowa (EC 2.4.2.1), adenozyina, inozyna, hipoksantyna, kwas moczowy; Roche Diagnostics Polska Sp. z o.o. – peroksydaza (EC 1.11.1.7), oksydaza ksantynowa (EC 1.1.3.22); deaminaza adenozyiny (EC 3.5.4.4); Fluka Chemie GmbH – luminol. Pozostałe odczynniki – P.O.Ch – Gliwice.

Procedura analityczna

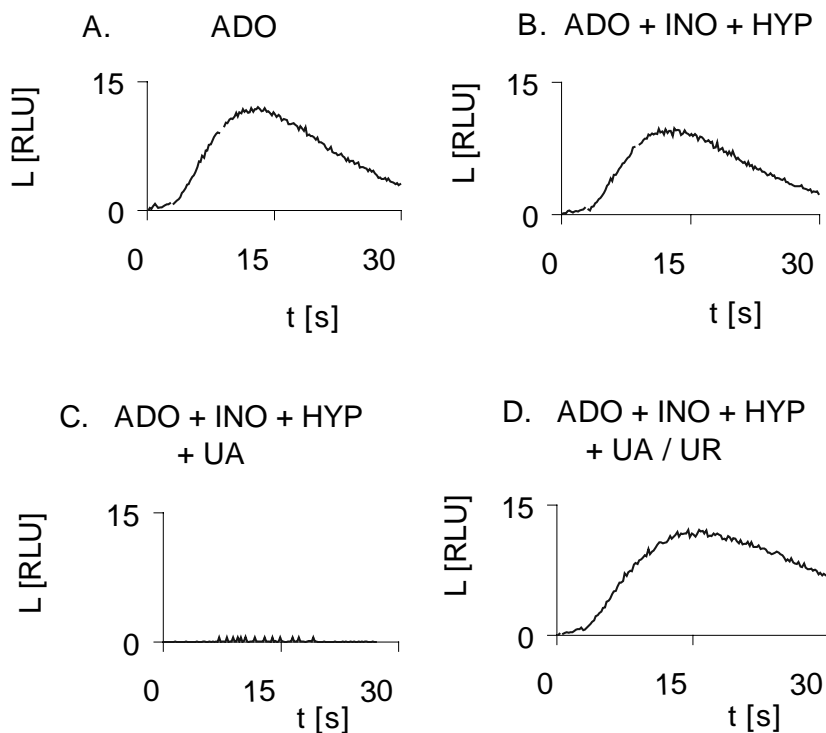
Do czterech jednorazowych kuwet (12×50 mm) wprowadzano po 20 μl próby badanej i 60 μl Reagentu I, po czym próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Następnie do każdej kuwety dodawano po 100 μl Reagentu II i po 5-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej dodawano po 20 μl wzorca ADO w ilości [pmole]: 1 do pierwszej kuwety, 2 do drugiej, 4 do trzeciej, a do czwartej 0 (tylko PBS). Do każdej kuwety – po jej umieszczeniu w komorze pomiarowej luminometru – automatycznie podawano Reagent III. Zapisu wielkości luminescencji, wyrażonej w relatywnych jednostkach świetlnych (RLU), dokonywano w sposób ciągły przez okres 30 sekund. Czynności te powtarzano dla każdej próby badanej, którą stanowiły: roztwory standardowe adenozyiny (0, 50, 150 i 300 nmol/l) oraz dializaty otrzymane w wyniku perfuzji kory nerek roztworami standardowymi adenozyiny.

Obliczenia

Maksymalna luminescencja (L) dla poszczególnych prób badanych stanowiła wartość średnią z pięciosekundowego okresu w przedziale 10–20 s. Wartość L po pierwiastkowaniu ($L^{1/2}$) pomniejszono o wartość próby ślepej ($L_0^{1/2}$). Na podstawie uzyskanych wartości wykreślano zależność $L^{1/2} - L_0^{1/2}$ od ilości dodanej adenozyiny [$L^{1/2} - L_0^{1/2} (\text{ADO}_d)$]. Równanie regresji uzyskanej krzywej posłużyło do obliczenia stężenia ADO w próbce.

WYNIKI

Rycina 1 przedstawia zmiany luminescencji w czasie reakcji oznaczania ADO (150 nmol/l) w trzech różnych środowiskach inkubacyjnych, tj. w środowisku samego buforu (ryc. 1A); w środowisku zawierającym inozynę i hipoksantynę (INO + HYP) (ryc. 1B); a w trzecim i czwartym – dodatkowo kwas moczowy (UA; ryc. 1C i 1D).

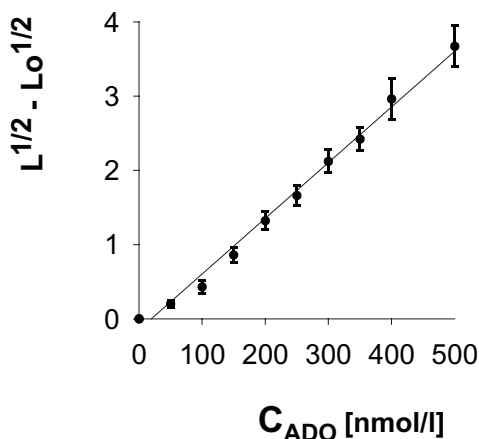


Ryc. 1. Kinetyka luminescencji dla roztworu wzorcowego adenozyiny (ADO) o stężeniu 150 nmol/l – w próbce zawierającej samą ADO (A), w próbce z dodatkiem inozyiny (INO; 50 nmol/l) i hipoksantyny (HYP; 200 nmol/l) (B, C, D) oraz kwasu moczowego (UA; 200 μ mol/l) (C, D). Próbkę zawierającą UA preinkubowano z urykazą (D). Luminescencję wyrażono w relatywnych jednostkach świetlnych (RLU) dla jednej serii pomiarów

Fig. 1. Kinetics of luminescence for standard solution of adenosine (ADO) at concentration 150 nmol/l – in the sample containing ADO alone (A), in the sample plus inosine (INO; 50 nmol/l) and hypoxanthine (HYP; 200 nmol/l) (B, C, D) and the uric acid (UA; 200 μ mol/l) (C, D). The sample containing UA was preincubated with uricase (D). Luminescence is expressed in relative light units (RLU) for one series of measurements

Maksymalną wartość luminescencji (w przedziale 12–16 s od zainicjowania reakcji) wynoszącą 12 RLU obserwowano, gdy w środowisku obecna była tylko adenozyina (ryc. 1A). Wartość maksymalna luminescencji uległa zmniejszeniu o około 3 RLU, gdy oprócz adenozyiny próba zawierała inozynę (50 nM) i hipoksantynę (200 nM) (ryc. 1B). Z kolei całkowite wygaszenie luminescencji nastąpiło, gdy mieszanina inkubacyjna dodatkowo zawierała kwas moczowy (200 μ M) (ryc. 1C). Jak przedstawiono na rycinie 1D, dodanie urykazy – enzymu degradującego kwas moczowy do alantoiny oraz peroksydazy – enzymu katalizującego rozkład nadtlenu wodoru do wody i tlenu – spowodowało wzrost luminescencji – maksymalnie do 11 RLU.

Maksymalna wartość luminescencji (L) dla roztworów standardowych ADO, wyrażona jako $L^{1/2}$ wykazywała liniową zależność ($R^2 = 0,99$) w zakresie stężenia ADO od 50 do 500 nmol/l (ryc. 2). Granica detekcji adenosyny w próbce, określona jako stosunek luminescencji próby badanej do próby zerowej $L/L_0 > 3$ wynosiła 40 nmol/l.

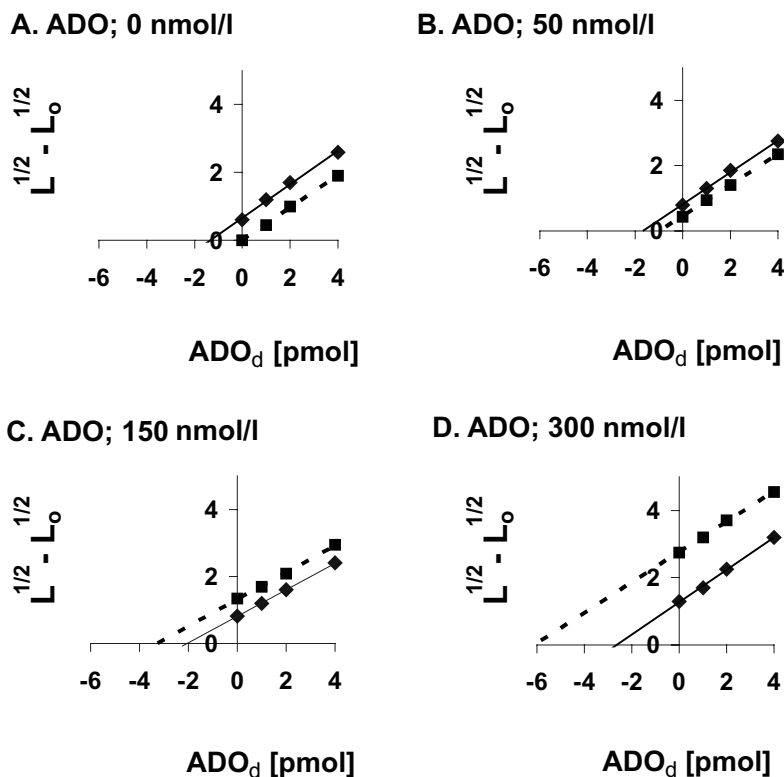


Ryc. 2. Zależność luminescencji od stężenia adenosyny w środowisku zawierającym INO, HYP i UA (odpowiednio: 50 i 200 nmol/l oraz 200 μ mol/l). Wynik wyrażono jako pierwiastek maksymalnej luminescencji próby badanej ($L^{1/2}$). Każdy punkt jest wartością średnią z 2–5 niezależnych pomiarów (\bar{x}) \pm SE

Fig. 2. Dependence of luminescence on adenosine concentration in samples containing INO, HYP and UA (respectively: 50 and 200 nmol/l and 200 μ mol/l). The results are expressed as square root of maximum luminescence of the tested sample ($L^{1/2}$). Each point is a mean value of 2–5 independent measurements (\bar{x}) \pm SE

W celu zminimalizowania wpływu składu matrycy na oznaczenie stężenia adenosyny w badanych próbach zastosowano metodę dodawania wzorca ADO w ilości 1, 2, 4 pmol/próbę. Rycina 3 przedstawia zależność luminescencji – wyrażonej jako różnica pierwiastków maksymalnej luminescencji próby badanej i próby zerowej ($L^{1/2} - L_0^{1/2}$) – od ilości wzorca dodanego do roztworów standardowych adenosyny (linia przerywana) i dializatów (linia ciągła). Na podstawie uzyskanych wartości w wyniku ekstrapolacji krzywych wyliczono, że stężenie oznaczone dla roztworu standardowego ADO 0 nmol/l wynosiło $5 \pm 0,8$; dla 50 nmol/l – $58 \pm 7,3$; dla 150 nmol/l – 136 ± 17 ; dla 300 nmol/l – 332 ± 37 . Precyzja metody określona współczynnikiem zmienności wynosiła odpowiednio 24; 22 oraz 19%.

Do perfuzji kory nerek szczura użyto roztwory standardowe ADO o stężeniu 0, 50, 150, 300 nmol/l. W otrzymanych dializatach określono stężenie ADO powyżej opisanym sposobem, a otrzymane wyniki przedstawiały się następująco: 78 ± 38 ; $66 \pm 8,2$; $102 \pm 13,9$; $117 \pm 32,9$ nmol/l.



Ryc. 3. Oznaczenie stężenia ADO w roztworach standardowych (■---■) oraz dializatach (◆—◆) metodą dodawania wzorca. Maksymalną wartość luminescencji (L) dla roztworów standardowych ADO o stężeniu 0, 50, 150 i 300 nmol/l oraz odpowiadających im dializatów oznaczano po dodaniu 1, 2, 4 pmol ADO (ADO_d). Na podstawie równania regresji krzywej $L^{1/2} - L_o^{1/2} (ADO_d)$ obliczono stężenie ADO w roztworach standardowych (n=5): $5 \pm 0,8$; $58 \pm 7,3$; 136 ± 17 ; 332 ± 37 oraz w dializatach (n=5): 78 ± 36 ; $66 \pm 8,2$; $102 \pm 13,9$; $117 \pm 32,9$

Fig. 3. Determination of ADO concentration in standard solutions (■---■) and dialysates (◆—◆) with method of pattern addition. The maximum value of the luminescence (L) for standard ADO solutions at concentration 0, 50, 150 and 300 nmol/l and corresponding dialysates was obtained after adding 1, 2, 4 pmol of ADO (ADO_d). The ADO concentration in standard solutions (n=5): $5 \pm 0,8$; $58 \pm 7,3$; 136 ± 17 ; 332 ± 37 and in dialysates (n=5): 78 ± 36 ; $66 \pm 8,2$; $102 \pm 13,9$; $117 \pm 32,9$ was counted on the basis of linear regression of $L^{1/2} - L_o^{1/2} (ADO_d)$

DYSKUSJA

Pobieranie płynu pozakomórkowego drogą mikrodiализy narządowej stało się ostatnimi laty ważnym narzędziem w badaniach nad metabolizmem zachodzącym w poszczególnych narządach oraz w badaniach poświęconych biodostępności leków. Stosowana szeroko, jak do tej pory, homogenizacja całego narządu a następnie procedura oznaczania wybranego analitu

w przygotowanym homogenacie nie odzwierciedla warunków panujących *in situ* [9]. Z tego też powodu w wielu laboratoriach wprowadza się mikrodializę narządów, która pozwala na pobieranie płynu pozakomórkowego celem ilościowego oznaczania badanego analitu [12]. Z względu na to, że dializę prowadzi się przy niewielkim przepływie wynoszącym zaledwie 0,1–5 $\mu\text{l}/\text{min}$, objętość otrzymanych próbek dializatu, a co się z tym wiąże, i ilość badanego analitu w próbce jest niewielka. Determinuje to rodzaj metody stosowanej do pomiaru analitu, charakteryzującej się przede wszystkim wysoką czułością.

Od wielu lat nasze laboratorium prowadzi badania poświęcone purynergicznej regulacji funkcji nerki. Jednym z agonów systemu purynergicznego jest adenozyne, która aktywując receptory P1 wpływa na funkcję hemodynamiczną, wydalniczą i wydzielniczą nerek [1, 11]. Jej stężenie w płynie pozakomórkowych zmienia się stanach (pat)fizjologicznych, czemu towarzyszy zmieniona odpowiedź nerek na adenozyne. W celu zbadania stężenia adenozyne w płynie śródmiąższowym nerki wprowadzono do panelu prowadzonych badań pobieranie płynu śródmiąższowego drogą mikrodializy narządowej i oznaczanie adenozyne w otrzymanych mikrodializatach. Jedną z metod stosowanych do oznaczania adenozyne jest metoda chemiluminescencyjna, w której adenozyne ulega enzymatycznej przemianie do kwasu moczowego i nadtlenu wodoru, a ten z kolei reaguje z luminolem dając, między innymi kwant światła. Sprzęt stosowany w metodzie chemiluminescencyjnej nie jest nazbyt skomplikowany, a sam proces oznaczania podlega znacznej automatyzacji. Jednakże tym, co ograniczało zastosowanie metody chemiluminescencyjnej do pomiarów adenozyne w mikrodializatach kory nerki, jest zakłócanie pomiarów przez kwas moczowy – reagujący z nadtlakiem wodoru konkurencyjnie do luminolu. Podobnie na przebieg oznaczania adenozyne metodą chemiluminescencyjną wpływa inozyne oraz hipoksantyna i ksantyna, gdyż w warunkach prowadzonego oznaczania (obecność w środowisku enzymów: fosforylaza inozyne i oksydaza ksantynowa) związki te są źródłem kwasu moczowego. W płynach ustrojowych stężenie kwasu moczowego jest stosunkowo wysokie, rzędu kilkudziesięciu μM , dlatego też kwas moczowy jest głównym czynnikiem interferującym w luminometryczne oznaczanie adenozyne i jej metabolitów. W celu zminimalizowania negatywnego wpływu endogenne kwasu moczowego na przebieg oznaczania adenozyne w osoczu, kwas moczowy usuwano z badanych próbek poprzez adsorpcję na kolumnach z wypełnieniem boranowym [7]. Ponieważ w metodzie tej stosuje się stosunkowo duże objętości próbek, tj. około 5-krotnie większe niż dostępne nam mikrodializaty, które ulegają dalszemu rozcieńczeniu, w obecnej pracy zastosowano enzymatyczne usuwanie kwasu moczowego z próbek badanych [4]. Próbki badane (roztwory standardowe, dializaty) wstępnie inkubowano z urykazą, enzymem degradującym kwas moczowy do alantoiny, a dodana w nadmiarze peroksydaza katalizowała reakcję usuwania nadtlenu wodoru z środowiska. W tak dobranych warunkach zminimalizowano negatywny wpływ kwasu moczowego na przebieg pomiaru stężenia adenozyne w próbkach, co zostało udokumentowane danymi przedstawionymi na rycinie 1; sygnał luminescencyjny otrzymany przy 150 nM adenozyne był całkowicie zniesiony w obecności kwasu moczowego (200 μM), a wstępna inkubacja próbki z urykazą i peroksydazą spowodowała przywrócenie sygnału do wartości kontrolnych.

Dodatkowym zabiegiem, ograniczającym interferencję inozyne, ksantyn i hipoksantyn oraz niezidentyfikowanych związków w przebieg ilościowego oznaczania adenozyne w płynach biologicznych było zastosowanie metody dodatku wzorca.

Przedstawiona metoda chemiluminescencyjna oznaczania nukleozydów, po częściowej modyfikacji, a także zastosowanie metody dodatku wzorca umożliwiła oznaczanie adenozyne

w płynie śródmiąższowym kory nerek, pobranym drogą mikrodializy narządowej, z precyzją rzędu 20%.

WNIOSKI

1. Metoda chemiluminescencji pozwala na oznaczanie adenozyiny w płynie śródmiąższowym kory nerek otrzymanym drogą mikrodializy narządowej.
2. Zastosowanie wstępnego etapu inkubacji dializatu z urykazaą pozwala na stosowanie metody chemiluminescencyjnej do oznaczania adenozyiny w próbkach zawierających kwas moczowy.
3. Zastosowanie metody dodawania wzorca pozwala uniknąć interferencji nieznanymi substancjami znajdującymi się w dializacie.

PIŚMIENNICTWO

1. Angielski S., Redlak M., Szczepańska-Konkel M.: Intrarenal adenosine prevents hyperfiltration induced by atrial natriuretic factor. *Miner. Electrolyte Metab.* 1990, 16, 1, 57. – 2. DiBona G.F., Kopp U.C.: Neural control of renal function. *Physiol. Rev.* 1997, 77, 1, 75. – 3. Hansen P.B., Schnermann J.: Vasoconstrictor and vasodilator effects of adenosine in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2003, 285, 4, F590. – 4. Jabs C.M., Neglen P., Eklof B., Thomas E.J.: Adenosine, inosine, and hypoxanthine/xanthine measured in tissue and plasma by a luminescence method. *Clin Chem.* 1990, 36, 1, 81. – 5. Jackson E.K., Raghvendra D.K.: The extracellular cyclic AMP-adenosine pathway in renal physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 2004, 66, 571. – 6. Jacobson K.A., Gao Z.G.: Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006, 5, 3, 247. – 7. Kather H., Wieland E., Waas W.: Chemiluminescent determination of adenosine, inosine and hypoxanthine/xanthine. *Anal. Biochem.* 1987, 163, 45. – 8. Osswald H.: Renal effects of adenosine and their inhibition by theophylline in dogs. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1975, 288, 1, 79. – 9. Osswald H., Schmitz H.J., Kemper R.: Tissue content of adenosine, inosine and hypoxanthine in the rat kidney after ischemia and postischemic recirculation. *Pflügers Arch.* 1977, 371, 1/2, 45. – 10. Schnermann J., Levine D.Z.: Paracrine factors in tubuloglomerular feedback: adenosine, ATP, and nitric oxide. *Annu. Rev. Physiol.* 2003, 65, 501.
11. Szczepańska-Konkel M., Jankowski M., Stiepanow-Trzeciak A., Rudzik A., Pawełczyk T., Angielski S.: Responsiveness of renal glomeruli to adenosine in streptozotocin-induced diabetic rats dependent on hyperglycaemia level. *J. Physiol. Pharmacol.* 2003, 54, 1, 109. – 12. Zou A.P., Wu F., Li P.L., Cowley A.W.: Effect of chronic salt loading on adenosine metabolism and receptor expression in renal cortex and medulla in rats. *Hypertension* 1999, 33, 1p.2. 511.

R. Kowalski, M. Jankowski, M. Szczepańska-Konkel

CHEMILUMINESCENT DETERMINATION OF ADENOSINE AND ITS METABOLITES IN TISSUES MICRODIALYSATES

Summary

Adenosine is one of regulative factors affecting renal function. It is considered that disturbances of kidney function in some pathophysiological conditions are the result of disturbances in adenosine signa-

ling, resulting from changes of its concentration in the extracellular liquid. Measurement of adenosine concentration in the interstitial liquid of the kidney in some pathophysiological states can contribute to the better recognition of the role of extracellular adenosine in the pathogenesis of kidney function disturbances. Accordingly, the chemiluminescent method of adenosine determination in microdialysate samples of rat renal cortex was initiated. Factors interfering in adenosine measurement - uric acid and inosine, hypoxanthine and xanthine were identified. The interference of uric acid was limited by the incubation of samples with the uricase, the enzyme degrading uric acid to allantoin. The method of pattern addition was used, what enabled the qualification of adenosine in dialysates, in the range of concentrations from 50 to 400 nmol/l, with precision defined by mean coefficient of variation at 23%.

The chemiluminescence method allows to determinate adenosine in the interstitial liquid of the kidney cortex received by microdialysis. The incubation of dialysate with uricase enables the usage of this method for determination of adenosine in samples containing uric acid. The method of pattern addition eliminates the interference of unknown matters present in the dialysate.

Adres: mgr Robert Kowalski

Samodzielna Pracownia Terapii Monitorowanej i Farmakogenetyki AMG

ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk

e-mail: rkowalski@amg.gda.pl