

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki medyczne i nauki o zdrowiu

Część I



www.mlodzinaukowcy.com

Poznań 2020

Redakcja naukowa

dr Jędrzej Nyckowiak

dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-66392-51-9)

ISBN (wydanie online 978-83-66392-73-1)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-66392-74-8)

Ilość znaków w książce: 454 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 11.4

Data wydania: czerwiec 2020

Niniejsza pozycja jest monografią naukową. Jej rozdziały zostały wydrukowane zgodnie z przesłanymi tekstami po ich zaakceptowaniu przez recenzentów. Odpowiedzialność za zgodne z prawem wykorzystanie użytych materiałów ponoszą autorzy poszczególnych rozdziałów.

Spis treści

1. Ekspresja protoonkogenu <i>c-fos</i> jako marker zmian plastycznych w układzie mezolimbicznym po jego wielokrotnej aktywacji	8
<i>Anioł Anna, Kubiak Aleksandra, Kozłowska Katarzyna, Uniatowska Patrycja, Ostrowska Kinga, Jagodzińska Roksana, Plucińska Karolina, Jerzemowska Grażyna</i>	
2. The role of the pedunculopontine tegmental nucleus in the development of motor disorders in Parkinson disease – part II	14
<i>Anioł Anna, Kubiak Aleksandra, Kozłowska Katarzyna, Uniatowska Patrycja, Ostrowska Kinga, Jagodzińska Roksana, Plucińska Karolina, Jerzemowska Grażyna</i>	
3. Mefedron – psychostymulant z grupy katynonów	20
<i>Gabriela Bielecka-Papierz, Aleksandra Dymek, Karolina Kiełbik, Joanna Stec, Małgorzata Łopatyńska-Mazurek, Ewa Poleszak</i>	
4. Tlenek azotu i jego rola w organizmie człowieka	25
<i>Gabriela Bielecka-Papierz, Aleksandra Dymek, Karolina Kiełbik, Joanna Stec, Małgorzata Łopatyńska-Mazurek, Joanna Filarowska-Jurko, Ewa Poleszak</i>	
5. Grelina – hormon działający plejotropowo	30
<i>Marta Czajkowska</i>	
6. Mechanizm działania kofeiny i jej wpływ na organizm	35
<i>Marta Czajkowska</i>	
7. CRISPR/Cas9: narzędzie do edycji genomu	41
<i>Agata Macionga, Kamila Stopińska, Wioletta Szywacz, Sylwia Mielcarska, Małgorzata Poręba</i>	
8. Wszystko jest zapisane w genach - FKBP5 czyli gen stresu i przemęczenia	46
<i>Agata Macionga, Wioletta Szywacz, Małgorzata Poręba, Sylwia Mielcarska, Kamila Stopińska</i>	
9. Rola białka c-FLIP w patogenezie tuszczycy	52
<i>Miśkiewicz Joanna, Strzelec Karolina, Krawczyk Agata, Kimsa-Dudek Magdalena, Strzałka-Mrozik Barbara</i>	
10. MikroRNA jako istotny czynnik regulacji apoptozy za pośrednictwem białka p53	58
<i>Miśkiewicz Joanna, Strzelec Karolina, Krawczyk Agata, Strzałka-Mrozik Barbara</i>	
11. Rola miR-15a/ miR-16 w patogenezie szpiczaka plazmocytoowego	64
<i>Miśkiewicz Joanna, Krawczyk Agata, Strzałka-Mrozik Barbara</i>	
12. Selektywny niedobór IgA	70
<i>Morawska Izabela, Mertowski Sebastian, Gosik Krzysztof</i>	
13. Przebieg włókien nerwowych szpiku kostnego i jego wpływ na lokalizację komórek hemopoetycznych	76
<i>Małgorzata Piątek, Renata Polaniak, Wiktoria Staśkiewicz, Sylwia Jaruga - Sękowska</i>	
14. Układ nerwowy a rola endogennych peptydów uwalnianych z białek żywności	83
<i>Marta Sobolczyk</i>	
15. Dualistyczna działalność wolnych rodników i charakterystyka wybranych antyoksydantów	89
<i>Staśkiewicz Wiktoria, Jaruga-Sękowska Sylwia, Piątek Małgorzata, Białek-Dratwa Agnieszka, Grajek Mateusz, Karolina Sobczyk</i>	

16. Charakterystyka wybranych antyoksydantów egzoogennych i endogennych oraz ich źródła	96
<i>Staśkiewicz Wiktoria, Jaruga-Sękowska Sylwia, Piątek Małgorzata, Białek-Dratwa Agnieszka, Grajek Mateusz, Karolina Sobczyk</i>	
17. Udział chemokin i ich receptorów w etiopatogenezie łuszczycy	103
<i>Karolina Strzelec, Joanna Miśkiewicz, Agata Krawczyk, Magdalena Kimsa-Dudek, Barbara Strzałka-Mrozik</i>	
18. Rola interleukiny 17 (IL-17) w przebiegu wybranych spondyloartropatii zapalnych	109
<i>Karolina Strzelec, Joanna Miśkiewicz, Agata Krawczyk, Dominika Wcisło-Dziadecka, Barbara Strzałka-Mrozik</i>	
19. Wpływ glikacji na właściwości wiążące albuminy w aspekcie tworzenia kompleksu z acetoheksamidem	115
<i>Szkudlarek Agnieszka, Rogóż Wojciech, Maciążek-Jurczyk Małgorzata</i>	

Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika trzy monografie dotyczących nauk medycznych i nauk o zdrowiu. W prezentowanych monografiach poruszany jest bardzo szeroki przekrój zagadnień z tej dziedziny wiedzy. Każda z nich zawiera po kilkanaście rozdziałów, które dają bardzo dobry przegląd tematyki naukowej jaką zajmują się studenci studiów doktoranckich na uczelniach medycznych lub ich najmłodszy absolwenci, którzy uzyskali już stopień doktora. Medycyna to bardzo ważna sfera naszego życia, aby rósł jej poziom i skuteczność bardzo ważny jest ciągły rozwój w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu. O tym, że tak się dzieje świadczy duża ilość prac naukowych z tej dziedziny publikowanych zarówno w obecnym cyklu wydawniczym „Młodych Naukowców” jak i w wydawnictwach wcześniejszych.

W pierwszej z monografii kilka rozdziałów poświęcono farmakoterapii. Analizowano terapie farmakologiczne w ciężkich postaciach schizofrenii, choroby Alzheimera oraz zaburzeń rytmu serca i ostrej choroby wysokogórskiej. Ta ostatnia z chorób dotyka relatywnie małej części społeczeństwa, gdyż niewiele jest osób, które chodzą po górach wyższych niż 2500 m.n.p.m., a po przekroczeniu tej wysokości choroba wysokogórska wystąpi z różnym nasileniem u 25% osób i u 75% osób powyżej 4500 m.n.p.m. Wg. autorów rozdziału najlepsza jest profilaktyka polegająca na aklimatyzacji, jednak możliwa jest też terapia lekowa, podaje się kilka rodzajów leków, z których najbardziej polecany jest acetazolamid. Innym z zagadnień jest omawiany w jednym z rozdziałów wpływ pyłów PM10 i PM2,5 na organizm człowieka, ten ostatni jest uznawany za najgroźniejszy dla człowieka, gdyż może przedostawać się z pęcherzyków płucnych do krwioobiegu i dalej do narządów wewnętrznych. Jego szkodliwość będzie zależała też od rodzaju substancji z jakich się składa, a mogą to być benzopireny, furany, dioksyny i inne niebezpieczne substancje.

W kolejnej monografii większość rozdziałów dotyczy nie bezpośrednio różnych rodzajów terapii, a bardzo szczegółowych analiz funkcjonowania organizmu człowieka. Ciągłe pogłębianie wiedzy o procesach zachodzących w naszych organizmach jest nie tylko ciekawe naukowo, ale i konieczne z uwagi na możliwości terapeutyczne. Pozwala to konstruować leki, których działanie może okazać się skuteczne tam gdzie dotychczasowy zasób znanych specyfików okazuje się nieskuteczny. Jeden z rozdziałów traktuje o istnieniu genu kodującego białko odpowiedzialne za modulację odpowiedzi na działanie stresu i wiedza ta może zostać wykorzystana przy leczeniu schorzeń takich jak depresja czy zespół stresu pourazowego.

Ostatnia monografia z wydawanego cyklu dotyczy raczej nauk o zdrowiu. Mamy tu rozdziały dotyczące wiedzy na temat profilaktyki chorób, wiedzy o szkodliwości e-papierosów, postawy wobec ruchów antyszczepionkowych. Z badań CEBOS wobec tego ostatniego zagadnienia wynika że tylko 2% rodziców miała sytuację, że zrezygnowała ze szczepienia swojego dziecka, przy czym podawaną przyczyną był zły stan zdrowia dziecka, a nie ogólny sprzeciw wobec szczepień. Można zatem odnieść wrażenie, że ruch antyszczepionkowy to tylko niewielka grupa osób, ale za to niezwykle aktywna medialnie. Podobnym zagadnieniem jest opinia społeczna na temat korzystania z pomocy psychiatrycznej lub psychologicznej, niestety z badań wynika że istnieje pewien irracjonalny lęk przed wizytą u tego typu specjalisty, pomimo tego że tylko 5,2% osób spotkała się z negatywnym odbiorem tego typu leczenia. Nie wydaje się to bardzo złym wynikiem, ale i tak 78% osób odczuwa lęk przed wizytą u specjalisty.

W niniejszej przedmowie przedstawiłem tylko wybrane zagadnienia poruszane w trzech wydawanych monografiach z zakresu nauk medycznych. Polecam lekturę wszystkich części, a czytelnikom życzę wielu przemyśleń związanych z tematyką zaprezentowanych prac badawczych. Ja uważam, że doktoranci i młodzi badacze z pasją i bardzo profesjonalnie podchodzą do swojej pracy, a doświadczenie jakie nabierają publikując prace w monografiach wydawnictwa Młodzi Naukowcy, pozwala im udoskonalać swój warsztat pracy.

dr hab. Jacek Leśny
prof. UPWR

1. Ekspresja protoonkogenu *c-fos* jako marker zmian plastycznych w układzie mezolimbicznym po jego wielokrotnej aktywacji

Protooncogen *c-fos* expression as a marker of plastic changes in the mesolimbic system after its repeated activation

Anioł Anna, Kubiak Aleksandra, Kozłowska Katarzyna, Uniatowska Patrycja, Ostrowska Kinga, Jagodzińska Roksana, Plucińska Karolina, Jerzemowska Grażyna

Katedra Fizjologii Zwierząt i człowieka, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

Anioł Anna: anna-anioł96@wp.pl

Słowa kluczowe: wczesne geny odpowiedzi komórkowej, białko c-Fos, stymulacja, brzuszne pole nakrywki śródmózgowia

Streszczenie

U zwierząt zmiana adaptacji do nowych warunków środowiska wymusza wypracowanie nowych strategii behawioralnych. Zmiany behawioru przeprowadzane są dzięki szybko adaptującym się neuronom w obrębie struktur zaliczanych do układu mezolimbicznego mózgowia (*mesolimbic system*; ML), których gwałtowna aktywacja może nastąpić również pod wpływem nadużywania różnych substancji psychoaktywnych. Dlatego też często podkreśla się rolę tego układu, nazywanego również układem nagrody, a także początkowej struktury tego układu – brzuszego pola nakrywki śródmózgowia (*ventral tegmental area* – VTA) w procesie powstawania uzależnień oraz odpowiedzialnego za reakcje napędowo-emocjonalne. Natomiast białko c-Fos, powstające w wyniku ekspresji protoonkogenu *c-fos*, wydaje się być jednym z najbardziej wiarygodnych markerów aktywności neuronalnej OUN. Podstawowy poziom mRNA protoonkogenu *c-fos*, jak i białka c-Fos jest niewysoki w większości komórek, jednak w zależności od użytego bodźca ulega gwałtownemu wzrostowi. Czas półtrwania białka c-Fos nie jest długi i trwa około 2 godzin. Dlatego też znaczenie badań z użyciem tego neuronalnego markera jest niezwykle cenne. Poniższe opracowanie ma na celu przedstawić aktualną wiedzę na temat roli protoonkogenu *c-fos* jako markera zmian plastycznych w ML.

1. Wstęp

Procesy plastyczne polegają na zdolności pojedynczych komórek nerwowych oraz ich zespołów do ulegania trwałym modyfikacjom budowy i funkcji w trakcie rozwoju, uczenia się, a także podczas przywracania funkcji po uszkodzeniach. Zjawisko to polega raczej na modyfikowaniu istniejących już połączeń neuronalnych, niż tworzeniu nowych. Plastyczność synaptyczna jest adaptacyjną odpowiedzią neuronu na powtarzającą się stymulację. Zmiany te mogą przyjmować formę sensytyzacji (zwiększonej wrażliwości) bądź tolerancji (zmniejszonej wrażliwości) na działający bodziec. Wydaje się jednak, że kierunek tych zmian w większym stopniu niż od rodzaju stosowanego bodźca, zależy od jego parametrów. Prowadzone przez Berger'a i in. (2002) doświadczenia prenatalne wykazały że wielokrotnie powtarzany stres unieruchomienia prowadzi do sensytyzacji układu mezolimbicznego (*mesolimbic system*; ML) u potomstwa unieruchamianych szczurów. Odnotowano u nich wzrost gęstości dopaminergicznych autoreceptorów typu D₂ oraz glutaminergicznych receptorów typu NMDA w rejonach kory czołowej (*frontal cortex*; FC) i przedczołowej (*prefrontal cortex*; PFC), hipokampie (*hippocampus*; Hip) i w jądrze półleżącym (*nucleus accumbens*; Acb) (Berger i in. 2002). Z kolei Moore w swojej pracy zwracał uwagę na znaczenie jakie może mieć częstotliwość zastosowanego bodźca aktywującego w układzie ML. Wykazał on między innymi, że poddanie szczurów chronicznemu stresowi, w przeciwieństwie do ostrej czy powtarzanej aktywacji może prowadzić do procesów habituacyjnych przejawiających się zmniejszeniem spontanicznej aktywności neuronów dopaminergicznych u tych szczurów (Moore i in. 2001).

W ostatnich latach stwierdzono, że dobrym markerem oceny zmian zachodzących procesów aktywujących czy też pouszkodzeniowych jest ekspresja neuronalna protoonkogenu *c-fos* – jednego z genów wczesnej aktywacji komórkowej (IEGs ang. *Immediate Early Genes*). Okazuje się, że ekspresja protoonkogenu *c-fos* w odpowiedzi na stres charakteryzuje się specyficznym wzorcem w zależności od rodzaju, natężenia i czasu trwania stresora (Chen i Herbert 1995), a także charakterystyki badanych zwierząt (Jerzemowska 2019) oraz wykazuje adaptację. Ponadto różne formy stresu powodują gwałtowny wzrost IEGs w specyficznych okolicach mózgu (Ceccatelli i in. 1989). Istnieje różnica w ekspresji *c-fos* w jądrze przykomorowym podwzgórza (*paraventricular nucleus of hypothalamus*; PVN) podczas stresu ostrego i chronicznego. Stres ostry powoduje znaczący wzrost ekspresji *c-fos*, podczas gdy stres chroniczny nieznacznie podnosi lub nie zmienia ekspresji *c-fos*, co prawdopodobnie spowodowane jest istnieniem ujemnego sprzężenia zwrotnego między glukokortykosteroidami a kompleksem AP-I (Chen i Herbert 1995)). Podobne zróżnicowanie w ekspresji *c-fos* jest obserwowane w bocznej przegrodzie (*lateral septum*; LS) (Chen i Herbert 1995) oraz w miejscu sinawym (*locus coeruleus*; LC) (Watanabe i in. 1997) w czasie-ostrego, jednorazowego oddziaływania stresora w porównaniu z wielokrotnym stresem.

Podsumowując, modulacja ekspresji *c-fos* zależy od rodzaju badanych struktur, czasowej charakterystyki eksperymentu oraz typu stresora wywołującego zmiany ekspresji *c-fos*, a zatem jest dobrym markerem zmian plastycznych nie tylko w ML, lecz w całym OUN.

2. Opis zagadnienia

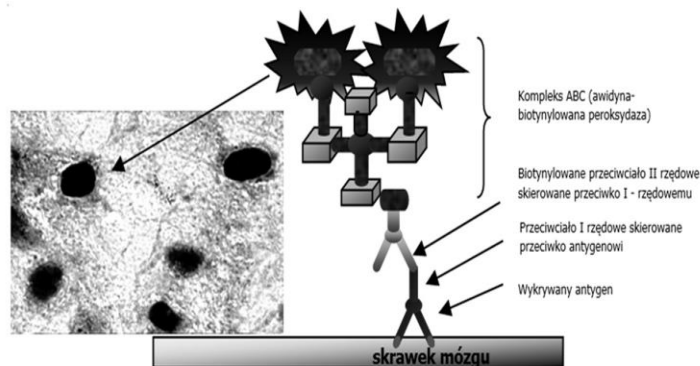
Już na początku XX wieku okazało się, że niektóre retrowirusy powodują u zwierząt nowotwory. W 1966 roku trzech badacze Finkel, Biskis i Jinkin (Finkel i in. 1996), wyizolowali z żeber i piersiowego odcinka kręgosłupa zarażonych kurcząt wirus mięsaka i określili go jako czynnik CF 1/An 1. Wyizolowany czynnik miał zdolność indukcji rozrostu nowotworowego w postaci kościstych guzów u młodych osobników (Finkel i in. 1996). Badanie genomu tych wirusów wykazało, że za zdolność indukcji rozrostu nowotworowego odpowiedzialne są fragmenty DNA, które nazwano onkogenami. Pięć lat później z dużym zaskoczeniem stwierdzono, że komórki eukariotyczne zawierają sekwencje DNA identyczne (Stehelin i in. 1976), lub sekwencje DNA wykazujące bardzo dużą homologię z retrowirusowymi onkogenami (Bishop 1985). Fakt występowania sekwencji podobnych do onkogenów we wszystkich prawidłowych komórkach spowodował, że nazwano je protoonkogenami, w celu odróżnienia ich od nadmiernie aktywnych onkogenów komórek nowotworowych (Jerzemowska 2009).

Protoonkogeny zwane również IEGs, kodują różnorodne produkty białkowe, których wspólną cechą jest regulacja cyklu komórkowego. IEGs należą również do genów, których ekspresja w komórkach niepobudzonych jest niska lub niewykrywalna, jednak są one gwałtownie wzbudzone na poziomie transkrypcji w ciągu kilku minut po zadziałaniu bodźca zewnątrzkomórkowego (Morgan i Curran 1991; Jerzemowska 2009).

W ostatnich latach odkryto wiele IEGs. Ich liczba obecnie sięga około 60, jednak tylko nieliczne z nich były poddane szczegółowej analizie. Jednymi z pierwszych odkrytych IEGs były *c-fos* i *c-myc*. Stanowią one prototyp całej rodziny genów IEGs. Obok nich do najlepiej poznanych należą geny z rodziny *fos* (poza *c-fos* również *fra-1*, *Fos B*) i *Jun* (*c-Jun*, *Jun B*, *Jun D*), a także inne jak *zif-268* (Lasoń 1997). IEGs są czynnikami regulatorowymi, które wpływają na aktywność transkrypcyjną późnych genów odpowiedzi komórkowej (Morgan i Curran 1991). Białkowe produkty tych genów pełnią rolę jądrowych przekaźników wiążących bodziec zewnątrzkomórkowy z długotrwałymi zmianami ekspresji genów w komórce (Jerzemowska 2009).

IEGs różnią się między sobą odmiennymi podstawowymi poziomami wzbudzenia. W komórkach nerwowych ekspresja genów *c-fos*, *Fos B*, *c-Jun* i *Jun B* jest niska lub niewykrywalna, w przeciwieństwie do rodziny *Jun D* i *zif-268*, gdzie podstawowe (spoczynkowe) poziomy ekspresji są dość wysokie. Jednak istnieje wspólna cecha wszystkich rodzin IEGs i dotyczy ona gwałtownego wzbudzenia na poziomie transkrypcji w ciągu minut po zadziałaniu bodźca zewnątrzkomórkowego (Jerzemowska 2009). Goelet i in. (1989) stwierdzili, że IEGs są dobrym markerem długoterminowych plastycznych zmian w mózgu leżących np. u podstaw sensytyzacji, adaptacji, uczenia się i pamięci oraz restytucji funkcji po uszkodzeniach. Do pozycji klasycznych należą prace Morgana i Currana

(1991), którzy udowodnili, że zarówno *c-fos* mRNA jak i białko Fos są dobrymi znacznikami zmian pouszkodzeniowych w korze motorycznej, hipokampie oraz innych okolicach limbicznych. Dla przykładu unieruchomienie, bądź domózgowe podawanie kapsaicyny (alkaloidu amidu 3-metoksy-4-hydroksyfenylometylowego kwasu 8-metylo-6-nonenowego z grupy wanilinoindólów wyizolowanego z pieprzowca tureckiego (*Fructus Capsici*), działającego w małych dawkach pobudzająco na komórki nerwowe) powoduje silny wzrost IEGs w jądrze środkowym ciała migdałowatego (*central nucleus of the amygdala*; CeAmg) i jądrze PVN. Dotyczy to zwłaszcza *c-fos*, *c-Jun* i *Jun B*, podczas gdy ekspresja *Jun D* jest bardziej selektywna i wzrasta tylko w PVN (Honkaniemi i in. 1992). Stres unieruchomienia powoduje także gwałtowny wzrost neuronalnego białka Fos w obu tych strukturach (Honkaniemi i in. 1992). Okazało się również, że przenoszenie z domowych klatek, osvajanie, ekspozycja na nowe otoczenie takie jak labirynt oraz otwarte pole, stres cieplny, stres osmotyczny, stymulacja bólowa, ból trzewny, dokomorowa iniekcja CRH, czy też iniekcja IL 1B (Ceccatelli i in. 1989; Honkaniemi i in. 1992), powodują wzrost ekspresji protoonkogenu *c-fos* w podobnych obszarach mózgowych takich jak: PFC (Rys.1), kora obręczy (*cingulate cortex*; CC), kora gruszkowata (*piriform cortex*; PIRC), kora skroniowa (*temporal cortex*; TC), jądro boczne przegrody (*lateral nucleus of the septum*; LS), Hip, ciało migdałowate (*amygdala*; Amg), jądra podwzgórza jak: PVN, nadwzrostkowe (*nucleus supraopticus*; SO), grzbietowo-przyśrodkowe (*dorsolateral nucleus of hypothalamus*; DL), LC, wyspy Calleja (*Calleja Island*; IC), jądro półleżące część korowa (*nucleus accumbens, part shell*; AcbSh).



Rys. 1. Schemat detekcji białka c-Fos przy użyciu metody immunohistochemicznej.

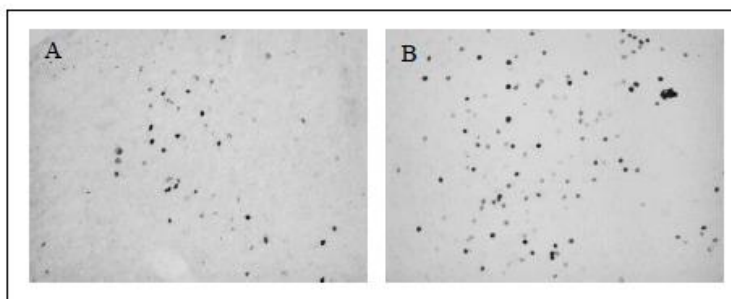
Prawa część ryciny przedstawia kolejne etapy barwienia białka c-Fos, natomiast lewa preparat własny pojedynczych jąder zawierających białko c-Fos w korze przedczołowej (*prefrontal cortex*; PFC) u szczura (pow. x100) (mikroskop świetlny Nikon Eclipse E600) (zmodyfikowany wg Jerzemowska 2009 i Kawka 2019).

3. Przegląd literatury

Zjawisko plastyczności może prowadzić do zmiany procesów przetwarzania informacji, a w ogólniejszym aspekcie do zmiany behawioru. Powstawanie uzależnień od środków farmakologicznych, związane z rozwojem tolerancji na efekty podawania tych substancji z jednej strony, z drugiej zaś rozwojem sensytyzacji behawioralnej, przejawiające się nasileniem reakcji samostymulacji jak również wzrostem aktywności lokomotorycznej, związane jest z ML oraz ze zmianami czynności tego układu w odpowiedzi na powtarzającą się stymulację (Watanabe i in. 1997). Ze względu na możliwość uzyskania reakcji samostymulacji ze wszystkich jego struktur przez wielu autorów uznawany jest on za element mózgowego systemu nagrody (m.in. Jerzemowska 2009). Udowodniono, że sensytyzacji wykształcającej się na skutek ciągłego podawania psychostymulantów na poziomie komórkowym towarzyszyć może nasilenie transmisji dopaminergicznej w strukturach ML takich jak brzuszne pole nakrywki śródmózgowia (*ventral tegmental area*; VTA) czy istota czarna (*substantia nigra*; SN) (Watanabe i in. 1997). Interferencja farmakologiczna w te ośrodki

zmienia reakcje samopodawania tych substancji u zwierząt. Ponadto przejawem sensytyzacji behawioralnej może być np. wzrost aktywności lokomotorycznej u szczurów poddanych powtarzanemu podawaniu kokainy (Kuschinsky i in. 2001). Wykazano powstawanie sensytyzacji przejawiającej się znacznym nasileniem aktywności ruchowej zwierzęcia w odpowiedzi na stymulację elektryczną VTA oraz obniżeniem progu pobudliwości układu dopaminergicznego na jej długotrwałą aktywację po chronicznym podawaniu metamfetaminy (Watanabe i in. 1997). Struktura ta łatwo podlega zmianom plastycznym (Glenthoj 1993). Jednorazowa stymulacja elektryczna VTA przez kolejnych 70 dni wykazała zwiększoną wrażliwość na elektryczną lub farmakologiczną aktywację neuronów dopaminergicznych nawet po siedmiu miesiącach od zakończenia doświadczenia. Zatem taka aktywacja struktury doprowadziła do sensytyzacji komórek i miała ścisły związek z behawiorem lokomotorycznym.

Istnienie związku między parametrami działającego bodźca a kierunkiem zmian plastycznych w układzie ML zostało potwierdzone badaniami przy użyciu technik detekcji IEGs (m.in. *c-fos*), jakie mają miejsce po krótkotrwałej lub długotrwałej samostymulacji elektrycznej pęczka środkowego przodomózgowia (*medial forebrain bundle*; MFB) - głównego szlaku eferentnych transmisji prowadzących z VTA do licznych obszarów zlokalizowanych w przodomózgowiu (Nakahara i in. 1999). Stwierdzono spadek, o ponad 50% liczby wybarwionych jąder komórkowych (we wszystkich badanych strukturach prócz bocznej powierzchni przedwzrokowej (*lateral ocular surface*; LOS) i jąder przednio-bocznego podwzgórza (*anterolateral hypothalamus nuclei*; AH)) u zwierząt poddanych długotrwałej samostymulacji, w stosunku do wyników uzyskanych po krótkiej (ok. 1h) sesji samostymulacji (Nakahara i in. 1999). Ponadto w badaniach Kawki (Kawka 2019), jednorazowa iniekcja morfiny do jądra konarowo-mostowego nakrywki (*pedunculopontine tegmenta area*; PPN) spowodowała zmiany w aktywacji układu ML na poziomie śródmózgowia. Zmiany te dotyczyły między innymi gęstości aktywnego białka *c-Fos* w obrębie parzystych jąder VTA (*nucleus parabrachialis pigmentosus*; PBP i *nucleus paranigralis*; PN) oraz w SN, w jego części zbitej (*substantia nigra, pars compacta*; SNC) i siatkowatej (*substantia nigra, pars reticulata*; SNR) (Rys.2). Wyniki te jednoznacznie wskazują, że jądro PPN zaangażowane jest w funkcjonowanie układu ML, a modulacja aktywności receptorów opioidowych na neuronach PPN wydaje się mieć ważny wpływ na bezpośrednie zmiany w aktywacji komórek dopaminergicznych nie tylko w VTA należącego do układu ML, lecz i SN należącego do układu nigrostriatalnego.



Rys. 2. Zdjęcia jąder zawierających białko *c-Fos* (protoonkogen *c-fos*) (kolor czarny) jednej z parzystych struktur brzuszego pola nakrywki śródmózgowia (*ventral tegmental area*; VTA) – *parabrachialis pigmentosus* (PBP) u szczurów z grupy kontrolnej (jednostronna stymulacja elektryczna VTA) (A) i doświadczałnej (morfina – jednorazowa i jednostronna iniekcja do jądra konarowo-mostowego nakrywki (*pedunculopontine tegmental nucleus*; PPN) wraz z jednostronną stymulacją elektryczną VTA do półkuli przeciwnej w stosunku do iniekcji) (B) (pow. 10x20) (mikroskop świetlny Nikon Eclipse E600) (Kawka 2019).

Immobilizacja i wymuszone pływanie są dla szczura bardzo silnym stresem i wywołują wyższą ekspresję *c-fos* w PFC, korze PIRC i CC oraz w LS (Emmert i Herman 1999) w porównaniu z efektami jakie daje w tych strukturach oddziaływanie łagodnego stresu w postaci: ekspozycji na nowość, osvajania z eksperymentatorem, przenoszenia z domowych klatek (Jerzemska 2009).

Takie same bodźce stresowe powodują różnice w ekspresji *c-fos* w Hip i jądrach przegrody (*septum*; S) u samic i samców szczura. Potwierdzeniem tego są badania w których 90 min. po podskórnej iniekcji formaliny stwierdzono większą liczbę aktywnych jąder *c-fos* u samic niż u samców we wszystkich okolicach Hip, natomiast 120 min. po iniekcji tej substancji ekspresja *c-fos* u samic była wyższa tylko w polu CA3 Hip (Ceccatelli i in. 1989). Ponadto, ekspozycja na otwarte pole powodowała znacząco większą ekspresję *c-fos* w zakręcie zębatym hipokampa (*dentate gyrus of the hippocampus*; DG) u samic w porównaniu z samcami. Istnieje także tendencja do wyższej ekspresji *c-fos* po stresie otwartego pola u samic w polach CA1 i CA3 Hip. Z kolei w jądrach S stwierdzono, że zarówno iniekcja formaliny jak i immobilizacja indukują ekspresję *c-fos* u obu płci, lecz liczba aktywnych komórek była większa u samców (Ceccatelli i in. 1989).

Ponadto, istnieją sugestie, że obserwowany model ekspresji *c-fos* jest niezależny od okresowych zmian koncentracji glukokortykosteroidów. Potwierdzają to badania, podczas których wykazano, że podawanie dekstrametazonu, który hamuje aktywację osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (PPN) i blokuje indukowany stresem wzrost poziomu glukokortykosteroidów, nie wpływa na wywołany immobilizacją wzrost immunoreaktywności *c-fos* w Amg (Honkaniemi i in. 1992) i w PVN (Kononen i in. 1992). Podobnie adrenalectomia nie ma wpływu na poziom *c-fos* po immobilizacji czy pływaniu (Halmenchi i in. 1996). Jednakże wcześniejsze doniesienia świadczą o tym, że adrenalectomia może zmieniać odpowiedź *c-fos* na stymulację stresową (Lu i in. 1993). Te odmienne wyniki sugerują, że nie tylko glukokortykosteroidy mogą modulować ekspresję *c-fos*, ale również modulacja ta zależy od rodzaju badanych struktur, czasowej charakterystyki eksperymentu oraz typu stresora wywołującego zmiany w ekspresji *c-fos* (Halmenchi i in. 1996).

4. Podsumowanie i wnioski

Poznanie działania obwodów neuronalnych ML w spoczynku jak i podczas jego aktywacji ma istotne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów lekozależności i zaburzeń w pobieraniu pokarmu. Można zatem sądzić, że badania oparte na analizie immunohistochemicznej detekcji białka Fos dotyczące jąder układu ML mogą mieć istotne implikacje kliniczne zarówno w diagnostyce terapii niektórych zaburzeń psychicznych, jak i chorób neurodegeneracyjnych, w tym tak wszystkim znanych chorób Parkinsona i Alzheimerera, które są związane z dysfunkcją układów dopaminergicznych mózgu, w dużej mierze odpowiadających za stan emocjonalny pacjenta.

Projekt, którego niniejsza publikacja stanowi wsparcie merytoryczne, został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2013/09/D/NZ4/02499.

5. Literatura

- Berger MA, Barros VG, Sarchi MI, et al. (2002) Long-term effects of prenatal stress on dopamine and glutamate receptors in adult rat brain. *Neurochemistry Research* 11: 1525–1533.
- Bishop JM (1985) Viral oncogenes. *Cell* 42: 23–38.
- Ceccatelli S, Villar MJ, Goldstein M, et al. (1989) Expression of c-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 9569–9573.
- Chen X, Herbert J (1995) Regional Changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, Hypothermic and endocrineresponses. *Neuroscience* 64(3): 675–685.
- Emmert MH, Herman JP (1999) Differential forebrain c-fos m-RNA induction by ether inhalation and novelty : evidence for distinctie stress pathways. *Brain Research* 845: 60–67.
- Finkel MP, Biskis BO, Jinkins PB (1966) Virus induction of osteosarcomas in mice. *Science* 151: 698–701.
- Glenthøj B, Mogensen J, Laursen H, et al. (1993) Electrical sensitization of the meso-limbic dopaminergic system in rats: a pathogenetic model for schizoprenia. *Brain Research* 619: 39–54.

- Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, et al. (1986) The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* 322: 419–422.
- Halmenchi DI, Cullian WE, Watson SJ (1996) The effect of adrenalectomy on stress-induced c-fos mRNA expression in the rat brain. *Brain Research* 706: 137–144.
- Honkaniemi J, Fuxe K, Recharadt L, et al. (1992) Colocalization of fos- and glucocorticoid receptor-like immunoreactivities in the rat amygdaloid complex after immobilization stress. *Journal of Neuroendocrinology* 4: 5447–555.
- Jerzemska G (2009) Aktywność hydroksylazy tyrozynowej i ekspresja protoonkogenu c-fos w mózgu szczurów o odmiennej charakterystyce behawioralnej. Uniwersytet Gdański 1–276.
- Kawka D (2019) Aktywność hydroksylazy tyrozynowej i białka Fos w śródmózgowiu po jednostronnej iniekcji morfiny do jądra konarowo-mostowego i stymulacji elektrycznej brzuszego pola nakrywki. Uniwersytet Gdański 1–77.
- Kononen J, Honkanemi J, Alho H, et al. (1992) Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic–pituitary axis after immobilization stress. *Endocrinology* 130: 3042–3047.
- Kuschinsky K, Alvarez DF, Shafer MK, et al. (2001) Sensitization to behavioural effects of cocaine: alternations in tyrosine hydroxylase or endogenous opioid mRNAs are not necessarily involved. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 363: 288–294.
- Lasoń W (1997) Ekspresja genów jako wyraz interakcji ligand-receptor. W: Receptory struktura, charakterystyka, funkcja. JB Zawilska (ed). Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 358–358.
- Lu J, Hathaway CB, Bereiter DA (1993) Adrenalectomy enhances Fos-like immunoreactivity within the spinal trigeminal nucleus induced by noxious terminal stimulation of cornea. *Neuroscience* 54: 809–818.
- Moore H, Rose HJ, Grace AA (2001) Chronic cold stress reduces the spontaneous activity of ventral tegmental dopamine neurons. *Neuropsychopharmacology* 24: 410–419.
- Morgan JI, Curran T (1991) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience* 14: 421–451.
- Nakahara D, Ishida Y, Nakamura M, et al. (1999) Regional differences in desensitization of c-fos expression following repeated self-stimulation of the medial forebrain bundle in the rat. *Neuroscience* 90: 1013–1020.
- Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, et al. (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260: 170–173.
- Watanabe T, Morimoto K, Nakamura M, et al. (1997) Modification of behavioural responses induced by electrical stimulation of the ventral tegmental area in rats. *Behavioural Brain Research* 93: 119–129.
- Rola jądra konarowo-mostowego w powstawaniu zaburzeń ruchowych w chorobie Parkinsona – część II.

2. The role of the pedunculopontine tegmental nucleus in the development of motor disorders in Parkinson disease – part II

Anioł Anna, Kubiak Aleksandra, Kozłowska Katarzyna, Uniatowska Patrycja, Ostrowska Kinga, Jagodzińska Roksana, Plucińska Karolina, Jerzemowska Grażyna

Katedra Fizjologii Zwierząt i Człowieka, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

Anioł Anna: anna-anioł96@wp.pl

Słowa kluczowe: głęboka stymulacja mózgu, zespoły hipertoniczno-hipokinetyczne, zaburzenia motoryczne, jądra podstawy

Streszczenie

Jądro konarowo-mostowe nakrywki (*pedunculopontine tegmental nucleus*; PPN), jedno z jąder siatkowatych pnia mózgu, ze względu na swe liczne koneksje ze strukturami ruchowymi, limbicznymi i tworem siatkowatym bierze udział w szeregu reakcji. Do tej pory udokumentowano jego rolę w procesach poznawczych, kontroli ruchowej, częściowej kontroli nad układem autonomicznym, nocycepcją, regulacją snu wolnofalowego, paradoksalnego, indukcji fal PGO czy rytmu theta. Degradacja tego jądra przebiega wraz z rozwojem choroby Alzheimerera, czy też w schizofrenii, lecz przede wszystkim obserwowana jest w chorobie Parkinsona. Obecnie trwają badania dotyczące szczegółowej roli PPN w rozwoju tej choroby. Stwierdzono między innymi, że jednostronna lezja PPN kwasem kainowym powodowała kontralateralny hemiparkinsonizm, objawiający się zniekształconą postawą i hipokinezą. Wykazano również, że w chorobie Parkinsona następuje utrata ~50% cholinergicznym neuronów części zbitej PPN. Zatem celem niniejszej pracy przeglądowej jest przedstawienie najważniejszych doniesień dotyczących roli PPN w powstawaniu zaburzeń ruchowych u osób z chorobą Parkinsona.

1. Wstęp

Jądro konarowo-mostowe nakrywki (*pedunculopontine tegmental nucleus*; PPN) jest ważną strukturą regulującą motorykę poprzez swoje połączenia ze wzgórzem (*thalamus*; Th), z podwzgórzem (*hypothalamus*; Hyp) oraz z jądrami podstawnymi (*basal ganglia*; BG), czyli z aktywującym tworem siatkowatym (*reticular formation*; RT) oraz obszarem lokomotorycznym śródmózgowia (Mena-Segovia i Bolam 2017). PPN zaangażowany jest w modulację pobudzenia, funkcje napędowe oraz motoryczne, reguluje również napięcie mięśni, postawę podczas poruszania się oraz generuje i moduluje neuronalną aktywność toniczną w trakcie lokomocji. Sam zaś nie jest strukturą zaangażowaną w zachowania lokomotoryczne. Świadczy o tym choćby fakt, że u szczurów lezja PPN kwasem ibotenowym nie zmienia spontanicznej aktywności lokomotorycznej w teście otwartego pola, natomiast iniekcja prokainy redukuje aktywność lokomotoryczną indukowaną iniekcją pikrotoksyny, amfetaminy lub N-metyl-D-aspartazy (NMDA) do jądra półleżącego (*nucleus accumbens*; Acb), gałki bladej (*globus pallidum*; GP) oraz do hipokampa (*hippocampus*; Hip) (Gut i Win 2015).

Okazuje się, że degradacja neuronów w istocie czarnej (*substantia nigra*; SN) oraz nadreaktywność jądra niskowzgórzowego (*nucleus subthalamic*; STh) mających bezpośrednie połączenie między innymi z jądrem PPN, prowadzi do powstania zespołu hipertoniczno-hipokinetycznych zaburzeń, określanego jako choroba Parkinsona (*Parkinson's disease*; PD) (Rochester i in. 2012). Najczęściej występującymi symptomami choroby PD są: drżenie spoczynkowe (zwłaszcza dystalnych części kończyn), spowolnienie ruchowe (bradykineza), sztywność mięśni oraz zakłócenia procesów inicjacji ruchu (akineza) (Jellinger 1988). Degeneracja neuronów SN powoduje zniesienie modulującego wpływu dopaminy na neurony prążkowa (*striatum*; S) i zmiany równowagi neurotransmitterowej w całym kompleksie jader podstawy. Nasiloną transmisją GABAergiczną na zakończeniach projekcji striatalnych zlokalizowanych w gałce bladej, jej części zewnętrznej (*globus pallidum, pars externum*; GPe) skutkuje odhamowaniem neuronów z STh, co z kolei prowadzi do

hyperaktywacji struktur efektorycznych zwojów podstawy w tym istoty czarnej części siatkowatej (*substantia nigra, pars reticulata*; SNR) (Mena-Segovia i Bolam 2017).

W poprzedniej pracy z 2019 roku (Mackiewicz i in. 2019) skupiliśmy się na roli jądra PPN u osób z chorobą PD w kontekście zastosowania najnowszej formy leczenia między innymi PD jaką jest głęboka stymulacja mózgu (*deep brain stimulation*; DBS). Obecna praca przeglądowa stanowi kolejną część rozważań udziału jądra PPN u chorych z PD, jednak dotyczy bardziej udziału tego jądra w mechanizmach regulacji motoryki u tych osób (część II). Zatem, celem tej pracy jest próba odpowiedzi na pytanie, czy na poziomie jądra PPN istnieją mechanizmy lub zależności o charakterze międzypółkulowym związane z regulacją funkcji motorycznych u osób z chorobą PD.

2. Opis zagadnienia

Jądro PPN po raz pierwszy zostało opisane w 1909 przez niemieckiego anatoma Louis'a Jacobsohn-Laska. Od tego czasu obszar ten jest przedmiotem licznych badań, które wykazały zaangażowanie tej struktury w szereg procesów organizmu, między innymi w pobieranie pokarmu, procesy poznawcze, regulację snu i czuwania oraz reakcje motoryczne (Gut i Winn 2015). Jądro PPN jest heterogenną strukturą, zlokalizowaną w górnej części pnia mózgu, pomiędzy SN a jądrem czerwonym (*red nucleus*; R) (Pienaar i in. 2013). Badania anatomiczne podzieliły cytoarchitektonicznie PPN na dwie części: część zbitą (*pars compacta*; PPNc) oraz część rozproszoną (*pars dissipata*; PPNd) (Pahapill i Lozano 2000). W PPN znajdują się zarówno komórki glutaminergiczne jak i GABAergiczne oraz cholinergiczne (Mena-Segovia i Bolam 2010). Jeszcze do niedawna uważano, że część PPN – PPNc w 80-90% składa się z neuronów cholinergicznych (Jones, 1991), natomiast w części PPNd dominują głównie neurony glutaminergiczne (Rye i in. 1987). Jednak współcześnie uważa się, że część PPNc jest głównie GABA-ergiczna, a część PPNd glutaminergiczna. Co do neuronów cholinergicznych, to obecnie uważa się, że neurony te bogato unerwiają zarówno jedną jak i drugą część PPN (Mena-Segovia i Bolam 2017).

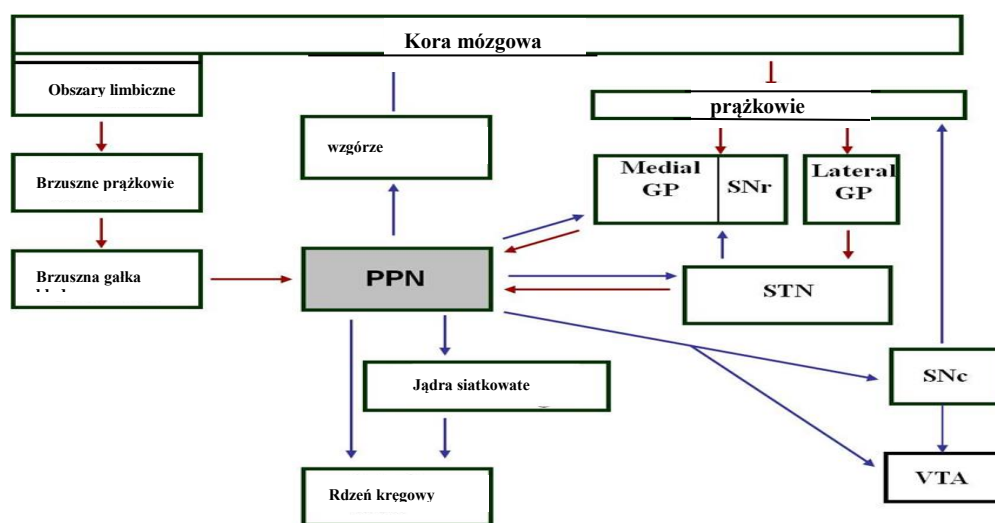
Zaangażowanie jądra PPN w szereg reakcji motorycznych organizmu wynika z tego, że posiada ono liczne połączenia aferentne i eferentne z wieloma strukturami mózgu (Rys.1). Jądro to odbiera między innymi projekcje z brzusznej gałki bladej (*ventral globus pallidum*; GPv) oraz z S. Natomiast wysyła liczne projekcje cholinergiczne do Th, co może sugerować jego modulację aktywności kory mózgowej przez Th (Lee i in. 2000). Jądro PPN posiada również bezpośrednie połączenia z układami motorycznymi mózgu, rdzeniem kręgowym oraz mózdzkiem i są to połączenia głównie cholinergiczne oraz glutaminergiczne (Pahapill i Lozano 2000). Liczne badania skupiają się właśnie na funkcji PPN w reakcjach motorycznych oraz na udziale tej struktury w powstawaniu deficytów ruchowych występujących w chorobach neurodegeneracyjnych, w tym również w PD (Mena-Segovia i Bolam 2017). Dowiedziono na przykład, że uszkodzenie PPN powoduje wzrost latencji reakcji u szczurów poddanych badaniom w teście wyboru – 5CSRT (*5-choice serial reaction time*). Metoda ta stosowana jest do modelowania zjawisk i patologii procesów psychicznych, takich jak: *face validity* (izomorfizm, czyli występowanie podobnych objawów w modelu zwierzęcym i patologii obserwowanej u ludzi), *predictive validity* (gdzie opisany wyżej model zwierzęcy pozwala również na przewidywanie działania leków na ludzi – użyteczny przede wszystkim w badaniach farmakologicznych) oraz *construct validity* (bazujący na homologicznym podłożu patologii lub reakcji) (Boguszewski 2004). W badaniach nad rolą PPN w regulacji motoryki wykazano między innymi, że degeneracja receptorów cholinergicznych w PPN może skutkować objawami w PD takimi jak zamrożenie chodu (*freezing of gait*; FoG) (Rochester i in. 2012). Obecnie najnowsze badania skupiają się na zastosowaniu DBS tej struktury jako nowej formy terapii objawów w PD (Pahapill i Lozano 2000).

3. Przegląd literatury

PPN jest częścią regionu ruchowego śródmózgowia (*locomotor region of the midbrain*; MRL) któremu przypisuje się udział w kontroli i inicjowaniu ruchu. Zaangażowanie jądra PPN w reakcje motoryczne wykazano doświadczalnie poprzez stymulacje elektryczne tego regionu u zwierząt doświadczalnych. Według Pahapilla i Lozano (2000) liczne połączenia PPN w tym z Th oraz

z rdzeniem kręgowym świadczą o potencjalnej funkcji tego jądra jako stacji przekaźnikowej wysyłającej informacje ważne dla inicjacji chodu i modulacji postawy. Autorzy ci stwierdzili również, że część PPN - PPNc stanowi element pętli sprzężenia zwrotnego układu limbicznego oraz rdzenia kręgowego do Th i jąder podstawy. Badania w których dokonywano lezji elektrolitycznych PPN skutkowało pojawieniem się hemiparkinsonizmu objawiającego się zgiętą postawą oraz hipokinezą w kończynach dolnych i górnych po stronie przeciwnej do tej lezji (Kojima i in. 1997).

Liczne badania kliniczne wykazały, że przy zaburzeniach akinytycznych, polegających na krótkotrwałym zahamowaniu zdolności ruchowych u chorych, które pojawiają się również u chorych z PD, występują zmiany degeneracyjne w PPN (Zweig i in. 1989; Jellinger 1988). Ponadto stwierdzono, że u chorych na PD wraz z objawami degradacji motorycznej pojawiają się jednocześnie uszkodzenia części podstawnej śródmózgowia i przodomózgowia oraz w SN jej części zbitej (*substantia nigra, pars compacta*; SNC). Równocześnie wraz z utratą motoryki uszkodzeniu ulegają również ciało migdałowate (*amygdala*; Amg), jądro przednie szwu (*anterior raphe nucleus*; RA), niektóre jądra Hyp i jądro PPN. W 2013 Pienaar wraz z zespołem (Pienaar i in. 2013) zbadali pośmiertnie zmiany jakie zaszły w PPN u pacjentów z PD. Badania wykazały wyraźną utratę zarówno neuronów GABAergicznych, cholinergicznych oraz w mniejszym stopniu glicergicznych. Ponadto wykazano odmienną budowę samych neuronów PPN. Okazało się, że komórki neuronalne u chorych na PD różniły się posiadaniem mniejszej liczby aktywnych mitochondriów w porównaniu do komórek neuronalnych w PPN u ludzi zdrowych. Badania te sugerują brak równowagi w aktywności neuronalnej w PPN, która może przyczyniać się do powstawania motorycznych objawów u chorych na PD.



Rys. 1. Schemat przedstawiający połączenia jądra konarowo-mostowego nakrywki (*pedunculopontine tegmental nucleus*; PPN) z innymi strukturami mózgu (zmodyfikowano wg Lee i in. 2000).

Objaśnienia: → połączenia eferentne (wychodzące), → połączenia aferentne (dochodzące). Medial/Lateral GP- środkowa/boczna część gałki bladej/*globus pallidum*; SNr- istota czarna, część siatkowata/*substantia nigra, pars reticulata*; SNC- istota czarna, część zbite/*substantia nigra, pars compacta*; VTA- brzuszne pole nakrywki śródmózgowia/*ventral tegmental area*; STN- jądro niskowzgórzowe/*subthalamic nucleus*.

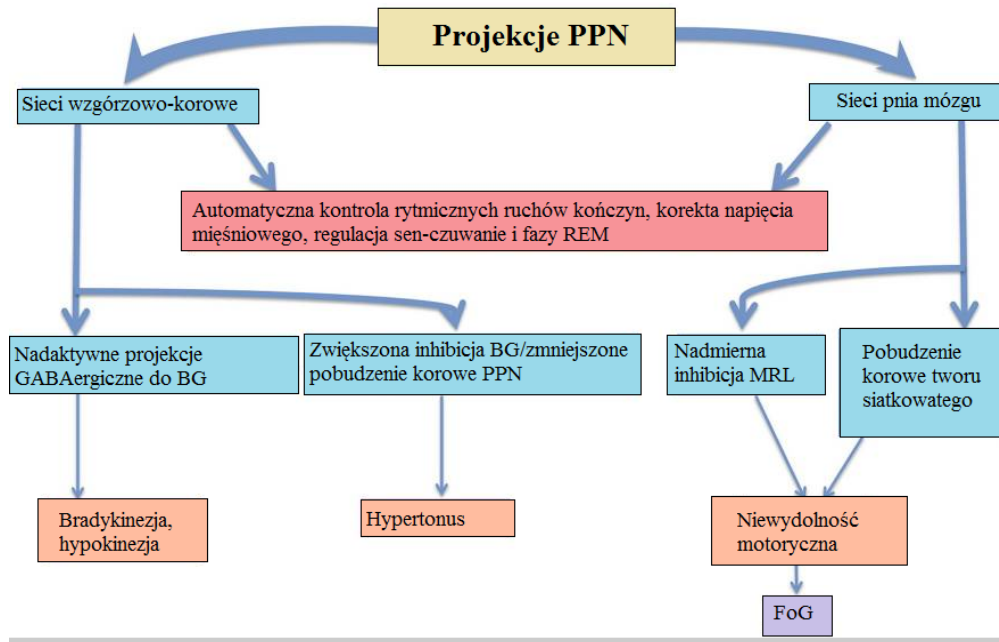
Jądra podstawy, które biorą udział w kontrolowaniu funkcji motorycznych, między innymi poprzez projekcje GABAergiczne z SNR, mają pośrednie i bezpośrednie wzajemne połączenia z PPN

(Frenchi i Muthusamy 2018). Do jąder podstawy zaliczamy między innymi SN, jądro ogoniaste skorupy (*caudate putamen*; CPu) oraz GP. PPN posiada również bezpośrednie połączenia z SNR oraz z GP z jej częścią wewnętrzną (*internal globus pallidum*; GPi). Zaburzenia chodu u pacjentów z PD wynikają z nadmiernej inhibicji MRL poprzez projekcje hamujące z SNR, które z kolei otrzymują projekcje z PPN (Takakusaki i in. 2004). Ponadto jądro PPN, które w normalnych warunkach spowodowałoby rozluźnienie mięśni, w wyniku nadmiernego hamowania może spowodować ich sztywność (Frenchi i Muthusamy 2018) (Rys.2).

Ze względu na liczne badania, które wskazują na zaangażowanie jądra PPN w powstawanie zaburzeń ruchowych, jądro to stało się potencjalnym celem DBS w leczeniu objawów choroby PD. W 2012 Thevathasan wraz zespołem (Thevathasan i in. 2012) przeprowadzili badania kliniczne z zastosowaniem stymulacji PPN u pacjentów z PD u których występowało FoG. Jest to charakterystyczny objaw tej choroby polegający na zatrzymaniu ruchu, który znacząco obniża jakość życia chorych. Badacze podzielili pacjentów na trzy grupy doświadczalne. Pierwszą z grup stanowili pacjenci z PD, u których występowały liczne objawy FoG (n=7), drugą grupę stanowili pacjenci z niewielką liczbą objawów FoG (n=8), natomiast pozostała trzecia grupa to grupa kontrolna składająca się ze zdrowych osób (n=9). U pacjentów z grup pierwszej i drugiej zaimplantowano obustronnie elektrody stymulujące do jądra PPN. W grupach tych oceniano objawy motoryczne u pacjentów przed samą stymulacją, podczas obustronnej i jednostronnej stymulacji elektrycznej PPN z rozgraniczeniem na półkulę lewą i prawą. Stwierdzono, że długotrwała stymulacja wyraźnie zredukowała epizody FoG u pacjentów, z czego najskuteczniejsza okazała się obustronna stymulacja PPN. Jednakże liczne badania wykazują, że stymulacja PPN u różnych pacjentów daje odmienne wyniki (Hamani i in. 2016). Może to wynikać z samego umiejscowienia elektrod stymulujących w określonej części PPN. W 2015 Gut i Win (Gut i Win 2015) przeprowadzili doświadczenia na szczurach, w których zbadali wpływ stymulacji elektrycznej w różnych obszarach PPN. Model zwierzęcy choroby PD osiągnięto poprzez obustronne lezje elektrolityczne w obrębie jądra PPN oraz zmniejszenie wydzielania dopaminy z SNC przy zastosowaniu neurotoksyny 6-hydroksydopaminy (6-OHDA). W badaniach tych stwierdzono, że stymulacja tylnej części PPN nieznacznie poprawiła chód, natomiast stymulacja przedniej części PPN spowodowała ciężkie epizody FoG oraz pogorszenie chodu.

Projekcje z grupy komórek cholinergicznnych typu Ch5 znajdujących się w obrębie jądra PPN oraz sąsiadującej grupy komórek cholinergicznnych typu Ch6 w obrębie jądra grzbietowo-bocznego nakrywki (*laterodorsal tegmental nucleus*; LDT) pobudzają komórki dopaminergiczne grupy A9 w SN oraz komórki dopaminergiczne grupy A10 w brzuszonym polu nakrywki śródmózgowia (*ventral tegmental area*; VTA) (Corrigan i in. 2002). Impulsacja wstępująca do VTA pochodzi z części zbitej PPN oraz z jądra LDT tworzących *pedunculo-pontine mesencephalic tegmentum* (PMT). Według autorów (Corrigan i in. 2002), projekcje cholinergiczne aktywują neurony dopaminergiczne poprzez receptory muskarynowe oraz nikotynowe. Natomiast iniekcja agonistów cholinergicznnych w okolice komórek dopaminergicznnych powoduje wzrost uwalniania dopaminy w okolicach jądra Acb i grzbietowej części prążkowiego (*dorsal striatum*; DS). Ponadto zaobserwowano, że wysoki poziom aktywności lokomotorycznej wiąże się ze wzrostem poziomu dopaminy w Acb (Miserendino i in. 2003). Zatem uważa się, że aktywacja receptorów nikotynowych w VTA może indukować aktywność lokomotoryczną (Yeomans i in. 2000), natomiast iniekcje do VTA skopolaminy, antagonisty receptorów muskarynowych, tak samo jak i iniekcje do PPN karbacholu, agonisty receptorów muskarynowych, przyczyniają się nie tylko do zwiększenia progu samostymulacji zwierząt i do zmniejszenia spożycia przez nich sacharozy i alkoholu, lecz również do zmniejszenia aktywności lokomotorycznej. Zatem po jednoczesnym pobudzeniu cholinergicznym VTA i wyłączeniu aktywności cholinergicznnej PPN otrzymano porównywalne wyniki. Autorzy pracy tłumaczą zjawisko możliwością zablokowania przez skopolaminę autoinhibitorów receptorów muskarynowych typu M2 przez co nastąpić mogło uwolnienie neuronów cholinergicznnych spod hamującego działania tych receptorów. Efektem mógł być wzrost impulsacji cholinergicznnej z PPN do VTA, a więc większe pobudzenie VTA. Według Katnera i współautorów (Katner i in. 1997) sama mikroiniekcja karbacholu do PPN powoduje supresję pobudzenia lokomotorycznego wywołaną iniekcją amfetaminy do Acb.

Zatem przytoczone doświadczenia są dowodem na istnienie znacznej korelacji czynnościowej między PPN a obszarami bezpośrednio zaangażowanymi nie tylko w aktywność motoryczną.



Rys. 2. Schemat przedstawiający zaangażowanie jądra konarowo-mostowego nakrywki (*pedunculopontine tegmental nucleus*; PPN) w neuropatologii choroby Parkinsona. (zmodyfikowano wg Frenchi i Muthusamy 2018).

Objaśnienia: BG- jądra podstawne/*basal ganglia*; MRL- region ruchowy śródmózgowia/*locomotor region of the midbrain*; FoG- zamrożenia chodu/*freezing of gait*.

4. Podsumowanie i wnioski

Liczne badania dowodzą, że patologiczne zmiany w jądrze PPN oraz zmiany w połączeniach tej struktury z innymi obszarami mózgu mogą być zaangażowane w powstawanie zaburzeń ruchowych w PD. Dokładniejsze zrozumienie funkcji tego jądra może pomóc w udoskonaleniu dotychczasowych metod leczenia tych zaburzeń i w opracowaniu nowoczesnych form terapii w celu poprawy jakości życia chorych na PD.

Projekt, którego niniejsza publikacja stanowi wsparcie merytoryczne, został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2013/09/D/NZ4/02499.

5. Literatura

- Boguszewski P (2004) Komputerowa rejestracja, analiza i modelowanie zachowania zwierząt w naukach biomedycznych. Konferencja „Nowe metody w neurobiologii” 41–48.
- Corrigal WA, Coen KM, Zhang J, et al. (2002) Pharmacological manipulations of the pedunculopontine tegmental nucleus in the rats reduce self-administration of both nicotine and cocaine. *Psychopharmacology* 160: 198–205.

- Frenchi IT, Muthusamy KA (2018) A Review of the Pedunculopontine Nucleus in Parkinson's Disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* 10: 99.
- Gut NK, Winn P (2015) Deep Brain Stimulation of Different Pedunculopontine Targets in a Novel Rodent Model of Parkinsonism. *Journal of Neuroscience* 35(12): 4792–4803.
- Hamani C, Aziz T, Bloem BR, et al. (2016) Pedunculopontine Nucleus Region Deep Brain Stimulation in Parkinson Disease: Surgical Anatomy and Terminology. *Stereotactic and Functional Neurosurgery* 94(5): 298–306.
- Jacobsohn LU (1909) *Über die Kerne des menschlichen Hirnstamms (Medulla oblongata, Pons und Pedunculus cerebri)* Berlin: Preussische Akademie der Wissenschaften.
- Jellinger K (1988) The pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 51(4): 540–543.
- Jones BE (1991) Paradoxical sleep and its chemical/structural substrates in the brain. *Neuroscience* 40, 637–656.
- Katner SN, McBride WJ, Lumeng L, et al. (1997) Alcohol intake of P rats is regulated by muscarinic receptors in the pedunculopontine nucleus and VTA. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 2: 498–504.
- Kojima J, Yamaji Y, Matsumura M, et al. (1997) Excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus produce contralateral hemiparkinsonism in the monkey. *Neuroscience Letters* 226: 111–114.
- Lee MS, Rinne JO, Marsden CD (2000) The pedunculopontine nucleus: its role in the genesis of movement disorders. *Yonsei Medical Journal* 41(2): 167–184.
- Mackiewicz J, Kawka D, Ostrowska K, et al. (2019) Rola jądra konarowo-mostowego w kontekście choroby Parkinsona i głębokiej stymulacji mózgu. *Nauki Medyczne i Nauki o Zdrowiu – Część VII – Choroby* 62–68.
- Mena-Segovia J, Bolam JP (2017) Rethinking the pedunculopontine nucleus: from cellular organization to function. *Neuron* 94: 7–18.
- Miserendino MJD, Haile CN, Kosten TA (2003) Stain differences in response to escapable and inescapable novel environments and their ability to predict amphetamine-induced locomotor activity. *Psychopharmacology* 167: 281–290.
- Pahapill PA, Lozano AM (2000). The pedunculopontine nucleus and Parkinson's disease. *Brain* 123: 1767–1783.
- Pienaar IS, Elson JL, Racca C, et al. (2013) Mitochondrial abnormality associates with type-specific neuronal loss and cell morphology changes in the pedunculopontine nucleus in Parkinson disease. *American Journal of Pathology* 183(6): 1826–1840.
- Rochester L, Yarnall AJ, Baker MR, et al. (2012) Cholinergic dysfunction contributes to gait disturbance in early Parkinson's disease. *Brain* 135: 2779–2788.
- Rye DB, Saper CB, Lee HJ, et al. (1987) Pedunculopontine tegmental nucleus of the rat: cytoarchitecture, cytochemistry, and some extrapyramidal connections of the mesopontine tegmentum. *Journal of Comparative Neurology* 259: 483–528.
- Takakusaki K, Oohinata-Sugimoto J, Saitoh K, et al. (2004) Role of basal ganglia-brainstem systems in the control of postural muscle tone and locomotion. *Progress in Brain Research* 143: 231–237.
- Thevathasan W, Cole MH, Graepel CL, et al. (2012) A spatiotemporal analysis of gait freezing and the impact of pedunculopontine nucleus stimulation. *Brain* 135(5): 1446–1454.
- Yeomans JS, Takeuchi J, Baptista M, et al. (2000) Brain stimulation reward thresholds raised by an antisense oligonucleotide for the M5 muscarinic receptor infused near dopamine cells. *Journal of Neuroscience* 20: 8861–8867.
- Zweig RM, Jankel WR, Hedreen JC, et al. (1989) The pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease. *Annals of Neurology* 26: 41–46.

3. Mefedron – psychostymulant z grupy katynonów

Mephedrone – psychostimulant from the cathinone group

Gabriela Bielecka-Papierz ⁽¹⁾, Aleksandra Dymek ⁽²⁾, Karolina Kielbik ⁽³⁾, Joanna Stec ⁽³⁾, Małgorzata Łopatyńska-Mazurek ⁽⁴⁾, Ewa Poleszak ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej i Społecznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾ Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽³⁾ Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Oddziałem Analityki Medycznej z Pracownią Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁴⁾ Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Ewa Poleszak

Gabriela Bielecka-Papierz: gabriela.bielecka@gmail.com

Słowa kluczowe: dopalacze, NPS, legal highs

Streszczenie

Dopalacze (nowe substancje psychoaktywne, ang. *new psychoactive substances (NPS), legal highs, designer drugs*) to grupa substancji projektowanych o szerokim spektrum działania oraz różnorodnej budowie. Ich działanie naśladuje efekty po zażyciu znanych substancji narkotycznych – może być psychostymulujące, halucynogenne, podobne do marihuany oraz opioidów. Do psychostymulantów należy mefedron, syntetyczna pochodna katynonu (substancja narkotyczna pochodząca z zimozielonego krzewu *Catha edulis* występującego w basenie Morza Czerwonego stosowana w celach rytualnych i rekreacyjnych). Popularność zdobył na początku XXI wieku, prawdopodobnie ze względu na łatwy dostęp, cenę oraz pogarszającą się jakość znanych psychostymulantów (amfetamina, kokaina, MDMA). Jego działanie jest podobne do substancji amfetaminopodobnych. Powoduje nasilenie aktywności, czujności, ma działanie empatogenne, ale również wywołuje arytmie, podnosi ciśnienie tętnicze oraz wywołuje zaburzenia psychiczne (depresję, psychozy). Wiadomo, że jego długotrwałe stosowanie prowadzi do wystąpienia tolerancji, czyli zmniejszenia odpowiedzi organizmu na dotychczasową dawkę. Użytkownicy mefedronu zgłaszają objawy wystąpienia zależności psychicznej i fizycznej. Mechanizm działania mefedronu opiera się na inhibicji wychwytu zwrotnego noradrenaliny, dopaminy i serotoniny w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym oraz nasileniu wyrzutu tych substancji do szczeliny synaptycznej. Niekorzystne oddziaływanie na zdrowie, ryzyko wywołania uzależnienia oraz brak zastosowania w medycynie spowodowały zdelegalizowanie mefedronu w Europie.

1. Wstęp

Nowe substancje psychoaktywne (NPS) (dopalacze, środki zastępcze, *legal highs, designer drugs*), to grupa nowych substancji wpływających na ośrodkowy układ nerwowy (OUN), która jest bardzo zróżnicowana pod względem budowy, działania i pochodzenia. Należą do nich m.in. substancje, które powstały w laboratoriach chemicznych w wyniku niewielkich modyfikacji znanych, nielegalnych substancji psychoaktywnych, ale także projektowane w celu uzyskania konkretnego działania w OUN. Uzyskane w ten sposób nowe związki nie były objęte kontrolą i można je było sprzedawać legalnie jako „środki kolekcjonerskie”, „sole do kąpiel”, „nawozy roślinne” do czasu ich delegalizacji (zmiany w prawie w 2018 r. Polsce penalizują wprowadzanie NPS na rynek). Działanie takich substancji jest podobne do znanych narkotyków, ale ryzyko ich stosowania jest o wiele większe. Nie wiadomo jakie dokładnie substancje zawarte są w sprzedawanych mieszankach oraz jak walczyć ze skutkami ich zażycia. Co więcej, preparaty tego typu często produkowane są w nieprofesjonalnych laboratoriach, co skutkuje zwiększeniem ryzyka zanieczyszczeń chemicznych i mikrobiologicznych (Nelle i Stępką 2015; Kała 2010). Liczba zatruc dopalaczami od 2011 do 2015 roku rosła, w związku z czym podjęto działania legislacyjne mające na celu łatwiejszą delegalizację

nowych substancji psychoaktywnych (NIK 2018). Do grupy tej należą substancje o różnych kierunkach działania, tj. substancje psychostymulujące, substancje o naśladującym działaniu marihuany, substancje halucynogenne oraz o działaniu opioidowym (Zawilska 2013). Do grupy dopalaczy stymulujących należy mefedron, pochodna katynonu występująca w *khat* (Czuwalicze jadalnej) (Europol-EMCDA 2010).

2. Opis zagadnienia

Związki psychostymulujące są zróżnicowane pod względem pochodzenia i budowy. Mogą występować naturalnie (kokaina, efedryna) lub mieć prekursor pochodzenia naturalnego (mefedron – pochodna naturalnego katynonu) albo być całkowicie syntetyczne. Substancje te mogą być różnorakiej budowy, np. amfetamina, metamfetamina, efedryna i inne są pochodnymi fenyloetyloaminy, a mefedron, metylon czy butylon są pochodnymi katynonu. Celem stosowania psychostymulantów jest polepszenie koncentracji, zwiększenie stanu czuwania i zwiększenie aktywności psychicznej, a także usuwanie objawów zmęczenia. Ich stosowanie skutkuje często również polepszeniem nastroju oraz nasileniem wiary we własne siły, co może skutkować zachowaniami ryzykownymi u ich użytkowników. Niestety istnieje wiele poważnych powikłań stosowania psychostymulantów, w tym ostre zatrucie, uzależnienie, wystąpienie stanów zagrożenia życia w związku z działaniem pobudzającym układ współczulny (wysokie ciśnienie, ryzyko udarów, zawałów) (Europol-EMCDA 2010; Płaźnik 2008; Schifano i in. 2011)

3. Przegląd literatury

Substancje psychostymulujące towarzyszą ludzkości od zarania dziejów. Powszechnie znana kokainę zawiera krzew krasnodrzewu pospolitego (*Erythroxylum coca*), którego liście żute są przez mieszkańców Andów w celach zwalczania choroby wysokościowej oraz zwiększenia wydolności organizmu w trudnych warunkach górskich, ale również były stosowane w rytuałach religijnych (Płaźnik 2008). Podobnie liście *khat* (*Catha edulis*) stosowane są już od czasów antycznych przez ludność zamieszkującą tereny basenu Morza Czerwonego w celach rekreacyjnych oraz w ceremoniach religijnych (Balint i in. 2009).

Do substancji psychostymulujących należy mefedron, będący pochodną naturalnie występującego w przyrodzie katynonu pochodzącego z rośliny *khat* (*Catha edulis*) występującej na obszarze graniczącym z wodami Morza Czerwonego (Schifano i in. 2011).

Khat (Czuwaliczka jadalna), wiecznie zielony krzew, stosowany był już przez ludność starożytną w celach rytualnych, w tym zachowały się źródła mówiące, iż Egipcjanie nazywali ją „boskim pokarmem”. W czasach obecnych jest w dalszym ciągu rozpowszechniony wśród mieszkańców Półwyspu Arabskiego oraz wschodniego wybrzeża Afryki, ale również w krajach zachodnich. Zażywany jest w postaci naparu, jego liście bywają także żute oraz palone (Balint i in. 2009). Roślina zawiera dwie psychostymulujące substancje: katynon ((S-(-)-2-amino-1-fenylopropan-1onu) oraz katynę (1S, 2S-pseudoefedryny) (Banjaw i Schmidt 2005). Wiadomo, że obie wykazują działanie podobne do amfetaminy, m.in. zmniejszają zmęczenie psychiczne i fizyczne, nasilają aktywność i wywołują bezsenność, polepszają zdolności poznawcze, koncentrację oraz wzmagają pewność siebie. Efekt działania katynonu ocenia się na połowę siły działania amfetaminy, a katyna wywołuje efekty 7-10 razy mniej nasilone niż efekty po amfetaminie (Hoffman i Al'Absi 2010).

Mefedron (1-(4-metylofenylo)-2-metylo-aminopropan-1-on; 4-metylometkatynon) należy strukturalnie do beta-keto amfetamin, jest pochodną katynonu. Znany jest pod różnymi nazwami slangowymi: „Meow meow”, „4-MMC”, „Meph”, „Drone” (Europol-EMCDA 2010). Choć raz pierwszy jego syntezy dokonał Saem de Burnaga w 1929 r. we Francji, to popularność zdobył na początku XXI wieku. W Europie pojawił się w 2007 r., a już w 2010 r. był na czwartym miejscu wśród najbardziej popularnych substancji odurzających w Europie zgodnie z danymi zebranymi przez Europejskie Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii. Jego atrakcyjność prawdopodobnie wynikała ze spadającej w tamtym okresie jakości i czystości kokainy i MDMA, a także dodatkowo przemawiała za nim konkurencyjna cena i jego łatwa dostępność w Internecie oraz

błędne przekonanie o niewielkiej szkodliwości tego psychostymulanta. Stosowany jest w większości przez osoby młode, w większości w wielu 15-24 lata w celu uzyskania efektu stymulującego i empatogennego (Schifano i in. 2011; Europol-EMCDAA 2010). Mefedron sprzedawany jest w formie chlorowodoru lub siarczanu jako biały, krystaliczny proszek, kapsułki lub tabletki (Urban i in. 2011). Zażywany jest doustnie (biodostępność wynosi zaledwie 10%) (White 2016), ale również donosowo, doodbytniczo oraz w postaci iniekcji dożylnych oraz domięśniowych (Europol-EMCDAA 2010).

Użytkownicy mefedronu porównują jego działanie do innych psychostymulantów, jak kokaina, amfetamina oraz MDMA (Carhart-Harris i in. 2011). Efekty jego stosowania można podzielić na pożądane i niepożądane przez osoby go zażywające. Do efektów „pożądanych” należy przede wszystkim znaczne polepszenie się nastroju, odczuwana jest euforia, podniecenie. Mefedron silnie pobudza psychicznie i fizycznie, a także polepsza funkcje poznawcze oraz nasila czujność. Ma działanie empatogenne, czyli nasilające odczuwanie empatii, otwartość emocjonalną, a także potrzebę bliskości. Polepsza umiejętności interpersonalne, zwiększa rozmowność, powoduje wzrost napięcia seksualnego. Użytkownicy mefedronu opisują, iż po jego zastosowaniu lepiej odczuwają doznania zmysłowe, w szczególności dźwiękowe. Podobnie jak inne amfetaminopodobne mefedron powoduje osłabienie apetytu, a podczas dłuższego stosowania chudnięcie (Schifano i in. 2011).

Kolejną kategorią działań mefedronu są te niepożądane przez jego użytkowników. Charakterystycznie dla stymulantów występują objawy z układu sercowo-naczyniowego. Pobudzenie układu współczulnego powoduje przyspieszenie pracy serca, jego niemiarową pracę, podwyższone ciśnienie, bóle wieńcowe. Skurcz naczyń powoduje silne bóle głowy, a także wywołanie charakterystycznego objawu u użytkowników mefedronu – sinienie palców stóp i rąk. Występują także zaburzenia układu pokarmowego, takie jak nudności, wymioty, bóle brzucha. Mogą wystąpić także zaburzenia w termoregulacji – temperatura obniżona lub podwyższona, z towarzyszącym wydzielaniem potu o charakterystycznym zapachu (tzw. „mefedronowy pot”), co pociąga za sobą odwodnienie. Wystąpić mogą także objawy grypopodobne, zmęczenie, rozszerzenie źrenic, bolesność stawów, wysypki i swędzenie skóry. Jeśli mefedron stosowany jest donosowo, mogą wystąpić owrzodzenia w jego śluzówce. Osoba po zażyciu mefedronu może być bardzo pobudzona i agresywna. Istnieje także ryzyko wystąpienia zaburzeń psychicznych, takich jak odczuwanie nadmiernego strachu, wystąpienie epizodów manii i depresji. Mogą wystąpić także halucynacje i psychozy. Mefedron powoduje także bezsenność, a także występowanie koszmarów sennych. Często zaburzenia psychiczne są na tyle nasilone, że istnieje potrzeba leczenia ich farmakologicznie. Efekty „niepożądane” mogą objawiać się także zaburzeniami neurologicznymi, w tym nasilonym napięciem mięśniowym, sztywnością karku czy zaburzeniami czucia (Schifano i in. 2011). Specyficznym objawem po długotrwałym stosowaniu mefedronu jest parkinsonizm. Wynika on z zatrucia organizmu manganem, który pochodzi z procesu produkcji mefedronu z pseudoefedryny z użyciem nadmanganianu potasu (Stepens i in. 2008).

Efekty działania mefedronu wynikają bezpośrednio z jego mechanizmu działania. Analogicznie do innych pochodnych katecholaminy, mefedron zwiększa stężenie noradrenaliny (NA), dopaminy (DA) i serotoniny (5-HT) w szczelinach synaptycznych ośrodkowego (OUN) i obwodowego układu nerwowego poprzez nasilenie ich wyrzutu oraz inhibicję ich wychwytu zwrotnego (jest nieselektywnym inhibitorem) (Schifano i in. 2011). Dane literaturowe donoszą, iż powinowactwo mefedronu do transportera dopaminowego jest pięć razy większe niż do transportera serotoninowego (Simmler i in. 2013). Właściwość tę znajdujemy w różnych strukturach mózgowia – transportery DA są blokowane w prążkowie, a 5-HT w hipokampie (Handlock i in. 2011). Mefedron nasila wyrzut DA i 5-HT w tych strukturach z siłą podobną do MDMA. Wykazano, że substancja wiąże się także z receptorami 5-HT_{2A} oraz α -1 adrenergicznymi (Simmler i in. 2013). W związku z opisanym mechanizmem obserwujemy aktywację struktur mózgowych w układzie mezolimbicznym, która skutkuje euforią, działaniem empatogennym, polepszeniem zdolności intelektualnych (Zawilska i in. 2013).

W związku z tym, iż mefedron nasila uwalnianie DA w OUN uważa się że ma on potencjał uzależniający (Simmler i in. 2013). W wyniku przeprowadzenia badania ankietowego u użytkowników mefedronu uzyskano niepokojące dane. 29,5% ankietowanych ujawniało minimum

3 objawy uzależnienia od substancji wg kryteriów DSM–IV (klasyfikacja zaburzeń psychiatrycznych wg Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego). Należały do nich m.in. trudna do opanowania chęć zażycia mefedronu, brak panowania nad jego stosowaniem, przyjmowanie substancji pomimo psychicznych, fizycznych i społecznych konsekwencji które ono generuje oraz najważniejsze kryterium – zwiększona tolerancja na narkotyki (Winstock i in. 2010).

W 2010 komitet naukowy Europejskiego Centrum Monitorowania Narkotyków i Narkomanii wezwał kraje członkowskie Unii Europejskiej do objęcia mefedronu kontrolą. Decyzja ta była podyktowana przeprowadzoną przez komitet analizą, która wykazała brak korzyści medycznych ze stosowania mefedronu, wystąpienie ryzyka uzależnienia oraz zagrożenia dla zdrowia oraz jego właściwości stymulujące (Dziennik Ustaw UE (2010/759/UE)). Polska wprowadziła mefedron na listę substancji psychotropowych I-P (substancje bez zastosowań medycznych, z potencjałem uzależniającym, stosowane jedynie w celu przeprowadzania badań naukowych) w 2010 r. w wyniku nowelizacji ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii. W 2018 r. usprawniono obejmowanie dopalaczy kontrolą prawną oraz zaostrzono kary za ich posiadanie (3 lata więzienia) i handel nimi (12 lat więzienia). Obecnie dopalacze będące na wykazie substancji psychotropowych, środków odurzających oraz nowych substancji psychoaktywnych traktowane są jak narkotyki (Ustawa z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii; NIK 2018).

4. Podsumowanie i wnioski

Dopalacze jako olbrzymia grupa substancji jest bardzo niejednorodna pod względem pochodzenia, budowy, szkodliwości, potencjału uzależniającego oraz kierunku działania. Istnieje wiele podziałów NPS, z czego najbardziej popularny jest ze względu na sposób działania: psychostymulujące, halucynogenne, podobne do marihuany oraz opioidowe. Do dopalaczy z kategorii psychostymulantów należy pochodna katynonu, mefedron. Katynon jest substancją aktywną występującą w *khat* (Czuwaliczce jadalnej), roślinie występującej na Półwyspie Arabskim i we wschodniej Afryce, która stosowana jest na tych terenach od czasów starożytnych. Ma działanie pobudzające i euforyzujące. Efekt działania syntetycznych pochodnych katynonu naśladuje działanie psychostymulantów takich jak amfetaminy, MDMA oraz kokaina. Mefedron jest związkiem o działaniu empatogennym, pobudzającym ośrodkowy i obwodowy układ nerwowy oraz wywołującym euforię. Ze względu na nasilenie odczuć zmysłowych po jego zażyciu stosowany jest w klubach muzycznych. Substancja powoduje wiele działań niepożądanych, tj. bóle wieńcowe, zaburzenia rytmu serca, zaburzenia psychiczne (bezsensowność, depresja, stany psychotyczne, stany lękowe), nieprawidłowości neurologiczne i inne. Charakterystycznym objawem u użytkowników mefedronu są zsiniałe palce oraz pot o ostrym, specyficznym zapachu. Powtarzające się zażywanie mefedronu może powodować rozwój uzależnienia psychicznego i fizycznego objawiające się między innymi rozwojem tolerancji na substancję oraz silną potrzebą jej zażywania pomimo strat w zdrowiu, życiu rodzinnym i społecznym. Jego działanie wynika w największym stopniu ze wzrostu stężenia neurotransmiterów w szczelnie synaptycznej uzyskanego w dwojaki sposób: poprzez inhibicję białek transportujących NA, DA i 5-HT, co hamuje wychwyty zwrotny tych neurotransmiterów oraz wskutek nasilenia wyrzutu tych przekaźników. Szczegółowy mechanizm działania nie jest jednak dokładnie znany, nie wiadomo jakie dokładnie są długofalowe skutki zażywania mefedronu, z jakimi konsekwencjami wiąże się jego podaż w wieku młodzieńczym w związku z czym istnieje potrzeba prowadzenia dalszych badań naukowych nad tym związkiem.

Niewątpliwie zażywanie dopalaczy stanowi olbrzymi problem wielu społeczeństw. Ich stosowanie wiąże się z wieloma kosztami społecznymi i zdrowotnymi ponoszonymi przez użytkownika, ale także stanowi wyzwanie dla różnych instytucji ochrony zdrowia oraz zajmującymi się uzależnieniami. Nie ulega wątpliwości, iż niezbędna jest ścisła kontrola nad tymi związkami. W Polsce mefedron jest nielegalny w produkcji, obrocie i posiadaniu od 2010 r., co umożliwiło ograniczenie jego rozpowszechnienia. Dodatkowo w 2018 wprowadzono zmiany w prawie ułatwiające dopisywanie NPS na listę substancji kontrolowanych oraz penalizujące wprowadzanie ich na rynek. Mimo to istnieje ciągła potrzeba monitorowania NPS już znanych oraz nowoprowadzanych oraz dostosowywanie zmian legislacyjnych do tak plastycznego i niebezpiecznego rynku dopalaczy. Pamiętać należy, iż to osoby młodociane są najbardziej narażone

na zagrożenia związane z NPS, w związku z czym niezbędne jest prowadzenie odpowiednio skrojonej kampanii edukacyjnej w szkołach w zakresie wiedzy o zagrożeniach ze strony tych substancji.

5. Literatura

- Balint E, Falkay G, Balint G (2009) Khat—a controversial plant. *The Middle European Journal of Medicine* 121:604–614.
- Banjaw MY, Schmidt WJ (2005) Behavioral sensitisation following repeated intermittent oral administration of *Catha edulis* in rats. *Behavioural Brain Research* 156: 181–189.
- Carhart-Harris RL, King LA, Nutt DJ (2011) A web-based survey on mephedrone. *Drug and Alcohol Dependence* 118: 19–22.
- Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej (2010/759/UE).
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2010) Europol-EMCDDA joint report on a new psychoactive substance: 4-methylmethcathinone (mephedrone) www.emcdda.europa.eu (dostęp 10.12.2019).
- Hadlock G, Webb K, McFadden L et al. (2011) 4-Methylmethcathinone (Mephedrone): Neuropharmacological Effects of a Designer Stimulant of Abuse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 339(2):530–536.
- Hoffman R, Al’Absi M (2010) Khat use and neurobehavioral functions: Suggestions for future studies. *Journal of Ethnopharmacology* 132: 554–563.
- Kała M (2010) Scena narkotykowa w Polsce z punktu widzenia toksykologa sądowego. *Przegląd Lekarski* 67(8): 594–597.
- Najwyższa Izba Kontroli (NIK) (2018) Nowelizacja ustawy o dopalaczach z uwzględnieniem wniosków NIK, <https://www.nik.gov.pl/aktualnosci/ustawa-o-dopalaczach-uwzględnione-wnioski-nik.html> (dostęp 10.12.2019).
- Nelle J, Stępa A (2015) Dopalmce, czyli środki zastępcze, w praktyce zespołów ratownictwa medycznego. *Na ratunek* 4:14–20.
- Płaźnik A (2008) Leki psychostymulujące. W: Kostowski W, Hermann Z (red.), (Red.): *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii 2* (s.181–189), Warszawa: PZWL.
- Schifano F, Albanese A, Fergus S et al. (2011) Psychonaut Web Mapping, ReDNet Research Groups: Mephedrone (4-methylmethcathinone; ‘meow meow’): chemical, pharmacological and clinical issues. *Psychopharmacology* 214: 593–602.
- Simmler LD, Buser TA, Donzelli M et al. (2013) Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *British Journal of Pharmacology* 168:458–470.
- Stepens A, Logina I, Liguts V et al. (2008) A Parkinsonian Syndrome in methcathinone users and the role of manganese. *The New England Journal of Medicine* 358:1009–1017.
- Urban M, Rudecki T, Wróblewski D i in. (2011) Zaburzenia psychotyczne związane z przewlekłym przyjmowaniem mephedronu. Opis przypadku. *Psychiatria Polska* 45(3):431–437.
- Ustawa z dnia 29 lipca 2005 r. o przeciwdziałaniu narkomanii. *Dziennik Ustaw* 2012.124.
- White MC (2016) Mephedrone and 3,4-Methylenedioxypropylvalerone (MDPV): Synthetic Cathinones With Serious Health Implications. *The Journal of Clinical Pharmacology* 56(11):1319–1325.
- Winstock A, Mitcheson L, Ramsey J et al. (2011) Mephedrone: use, subjective effects and health risks. *Addiction* 11(106):1991–1996.
- Zawilska J (2013) Co nowego w świecie "dopalaczy"? *Wszechświat* 114 (1-3):12–18.
- Zawilska J, Słomiak K, Wasiał M i in. (2013) Pochodne β -katorynu - nowa generacja niebezpiecznych związków psychostymulujących z grupy „dopalaczy”. *Przegląd Lekarski* 70(6).

4. Tlenek azotu i jego rola w organizmie człowieka

Nitric oxide and its role in human body

Gabriela Bielecka-Papierz⁽¹⁾, Aleksandra Dymek⁽²⁾, Karolina Kiełbik⁽³⁾, Joanna Stec⁽³⁾,
Małgorzata Łopatyńska-Mazurek⁽⁴⁾, Joanna Filarowska-Jurko⁽⁴⁾, Ewa Poleszak⁽¹⁾

⁽¹⁾ Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej i Społecznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾ Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽³⁾ Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej z Oddziałem Analityki Medycznej z Pracownią Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽⁴⁾ Katedra i Zakład Farmakologii z Farmakodynamiką, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Ewa Poleszak

Gabriela Bielecka-Papierz: gabriela.bielecka@gmail.com

Słowa kluczowe: cGMP, NO, EDRF

Streszczenie

Tlenek azotu (NO) to niewielka, bardzo labilna cząsteczka gazowa występująca w ludzkim organizmie. W latach osiemdziesiątych uwaga badaczy skierowała się na mechanizm rozkurczu mięśniówki naczyń krwionośnych. Okazało się, iż w procesie wazodylatacji kluczową rolę odgrywa czynnik wydzielany przez śródbłonek naczyń nazwany EDRF (ang. *endothelium-derived relaxing factor*). W toku doświadczeń okazało się iż jest nim tlenek azotu. NO syntezowany jest w ludzkim organizmie z L-argininy przez enzym syntaza tlenku azotu (NOS). Wyróżniamy izoformy: endotelialną, neuronalną (i jej odmianę mitochondrialną) oraz indukowaną. Różne izoformy syntazy są pobudzane do produkcji NO poprzez różne czynniki, w tym cytokiny, lipopolisacharyd bakteryjny czy acetylocholinę. NO znajdujemy w tkankach układu nerwowego, gdzie odgrywa rolę atypowego neurotransmitera, wpływającego m.in. na procesy uczenia się, odczuwania bólu, rozwoju uzależnienia. Obecny jest również w naczyniach krwionośnych, gdzie bierze udział w procesie regulacji ciśnienia krwi. Wykazuje także działanie antyagregacyjne na płytki krwi. NO w wysokich stężeniach ma działanie toksyczne dla patogenów oraz komórek nowotworowych, w związku z czym obecny jest w komórkach układu odpornościowego. NO swoje efekty wywiera poprzez wpływ na sGC (rozpuszczalna cyklaza guanylowa) która produkuje drugorzędowy przekaźnik cGMP (cykliczny guanozyl-3',5'-monofosforan). Rozpowszechnienie i ilość efektów, które wywołuje NO ukazują olbrzymie jego znaczenie dla utrzymania homeostazy w ludzkim organizmie.

1. Wstęp

Tlenek azotu (NO) to substancja występująca naturalnie w przyrodzie, a w organizmie człowieka pełniąc wiele różnorodnych funkcji. Jedną z nich jest zdolność do regulacji ciśnienia krwi, której mechanizm rozpoczęto badać w latach 80` XX wieku. Doświadczenia przeprowadzane przez Roberta F. Furchgotta, Louisa J. Ignarro i Ferida Murada obejmowały badania nad substancją wydzielaną przez śródbłonek naczyń krwionośnych. W toku doświadczeń odkryto, iż ma ona właściwości wazodylatacyjne (naczyniorozszerzające) i nazwano ją EDRF - ang. *endothelium-derived relaxing factor* - czynnik rozkurczowy pochodzenia śródbłonkowego. Badacze wykazali, iż substancja ta to tlenek azotu. Odkrycie znaczenia tlenku azotu w regulacji ciśnienia krwi doprowadziło wymienionych badaczy do zdobycia Nagrody Nobla z dziedziny medycyny i fizjologii w 1998 r, co potwierdza olbrzymie znaczenie tlenku azotu w funkcjonowaniu organizmu człowieka (<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1998/summary/>). NO odkryto także w innych tkankach, m.in. w tkance nerwowej ośrodkowego układu nerwowego. Odgrywa tam rolę nietypowego, gazowego neuroprzekaźnika. Bierze także udział w procesach leżących u podstaw rozwoju uzależnienia od substancji psychoaktywnych, w odczuwaniu lęku czy pobierania pokarmu (Uzby

i Ogelsby 2001). Fizjologicznie tlenek azotu znajduje się także w komórkach układu odpornościowego i tkance mięśniowej (Prado i in. 2011).

2. Opis zagadnienia

NO to cząstka gazowa mająca w ludzkim organizmie wiele ról biologicznych. U człowieka powstaje ona przy udziale enzymu syntazy tlenku azotu (NOS - ang. *nitric oxide synthase*). W różnych rodzajach tkanek tlenek azotu spełnia odmienne funkcje, w związku z czym istnieją odrębne odmiany syntazy tlenku azotu. Aktywność biologiczna NO jest bardzo szeroka, a jego synteza zależna od wielu czynników. Odpowiednia ilość tlenku azotu jest niezbędna do utrzymania stanu zdrowia, jednakże zaburzenia jego syntezy (czy to zbyt duża, czy zbyt mała ilość) mogą być przyczyną powstawania wielu chorób, począwszy od zmian w układzie krążenia prowadzących do nadciśnienia tętniczego i mogących w konsekwencji skutkować zawałem czy udarem, po zmiany w obrębie ośrodkowego układu nerwowego.

3. Przegląd literatury

Tlenek azotu to niewielka, lipofilowa cząstka, łatwo dyfundująca przez błony komórkowe, a jej rozpowszechnienie w ludzkim organizmie świadczy o szerokiej aktywności farmakologicznej (Sharma i in. 2007). Jego cząsteczka jest jednak wyjątkowo labilna – w przeciągu 6-10 sekund przy udziale tlenu i wody powstają z niej azotany i azotyny (Uzby i Oglesby 2001). W związku z tym, że NO ma niesparowany elektron należy do wolnych rodników i może łatwo reagować z innymi molekułami takimi jak tlen, nadtlenki czy metale przejściowe (Prado i in. 2011).

Produkcja tlenku azotu ma miejsce w wielu tkankach, a katalizowana jest przez syntazę NO (NOS). Do tej pory opisano odmianę indukowaną (iNOS), śródbłonkową, zwana także endotelialną (eNOS), neuronalną (nNOS) i jej izoformę mitochondrialną (mtNOS) (Zhou i Zhu 2009). Literatura podaje, iż syntaza NOS indukowana występuje w komórkach układu odpornościowego (granulocyty obojętnochłonne i kwasochłonne, makrofagi i inne) (Prado i in. 2011). Odmiana endotelialna znajduje się natomiast w śródbłonku naczyń krwionośnych oraz w nabłonku wyściełającym układ oddechowy (Shaul 2002). Z kolei nNOS ulega ekspresji w neuronach oraz mięśniach poprzecznie prążkowanych i w mięśniu sercowym (Zbrojkiewicz i Śliwiński 2016). Aktywność każdej NOS jest uzależniona od związania się jej z kalmoduliną (Sharma i in. 2007), ale odmiany konstytutywne enzymu nNOS i eNOS zależne są dodatkowo od obecności Ca^{2+} i czynników zwiększających jego poziom we krwi, takich jak acetylocholina, estrogeny, bradykinina, histamina, serotonina, endotelialny czynnik wzrostu (Ścibior i Czeczot 2005). Forma indukowana syntazy NO jest niezależna od obecności jonów wapnia, stymulowana jest natomiast przez endotoksyny bakteryjne - lipopolisacharyd (LPS), bradykininę, cytokiny prozapalne takie jak czynnik martwicy nowotworów (TNF- α), interferon γ (IFN- γ) i interleukinę 1 (IL-1) (Ścibior i Czeczot 2005). Ilość tlenku azotu produkowanego przez nNOS i eNOS jest na poziomie pikomolowym zabezpieczającym bieżące potrzeby organizmu, a syntaza działa krótko. Z drugiej strony iNOS, daje około 100-1000 razy więcej NO niż formy konstytutywne oraz jest aktywna przez dłuższy czas (kilka godzin-kilka dni) w odpowiedzi na kontakt z patogenem (Sokołowska i Włodek 2001; Zhou i Zhu 2009; Guix i in. 2005).

Synteza NO jest dwuetapowa. Substratami są tlen i L-arginina - głównie jej osoczowa forma i w mniejszej ilości arginina powstała w cyklu przemian arginina/cytrulina oraz powstała poprzez degradację białek. W pierwszej fazie cząstka aminokwasu jest hydroksylowana przy udziale NADPH, z powstaniem N- ω -hydroksy-L-argininy. Następnie ten produkt pośredni zostaje utleniony do L-cytruliny z wytworzeniem cząsteczki tlenku azotu. W procesie biorą udział kofaktory takie jak dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADPH), dinukleotyd flawinowy (FMN), dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD), tetrahydropteryna (BH4) i hem (Ścibior i Czeczot 2005).

Aktywność biologiczna tlenku azotu jest bardzo szeroka. W latach osiemdziesiątych XX wieku Robert Furchgott odkrył, iż śródbłonek naczyń produkuje nieznanym wcześniej związek, który powoduje rozkurcz ich mięśniówki, co prowadzi do spadku ciśnienia krwi. Cząstkę tę nazwano EDRF (ang. – *endothelial-derived relaxing factor*), a w kolejnych badaniach odkryto, iż jest nią właśnie tlenek azotu. Jego działanie w układzie krwionośnym nie ogranicza się do regulacji ciśnienia krwi.

Obserwuje się także jego efekty przeciwzakrzepowe wynikające z hamowania agregacji i adhezji płytek krwi (Furchgott i Zawadzki 1980; Furchgott 1988). Niestety, NO ma także udział w patogenezie chorób układu sercowo-naczyniowego takich jak miażdżycy i nadciśnienie tętnicze oraz prowadzi do zwężenia naczyń w mózgu i wieńcowych, co może powodować niedokrwienie narządów przez nie zaopatrywanych (Simon i in. 2007). Odkrycia związane z NO jako cząstką mającą udział w regulacji ciśnienia krwi skutkowały otrzymaniem nagrody Nobla przez trzech badaczy: Roberta F. Furchgotta, Louisa J. Ignarro i Ferida Murada w 1998 r. (The Nobel Assembly at Karolinska Institutet 1998).

Udowodniono, iż tlenek azotu ma wpływ na układ immunologiczny oraz przebieg chorób zapalnych. Makrofagi i inne komórki układu odpornościowego wydzielają tlenek azotu, który działa toksycznie na patogeny, a także komórki rakowe (Förstermann i Sessa 2012). Według Kröncke i in. (2001) NO może działać jako aktywator, ale także supresor reakcji immunologicznej. Literatura wskazuje także, iż nadmierna produkcja NO w trakcie przewlekłych stanów zapalnych prowadzi do zbyt nasilonej aktywacji cyklooksygenazy (COX), w wyniku czego powstaje nadmierna ilość prostaglandyn i rodników tlenowych. W układzie krwionośnym może to prowadzić do poszerzenia naczyń krwionośnych, a w konsekwencji do spadków ciśnienia. W przypadku większych tętniczek nasilenie aktywacji COX może prowadzić do zwiększonej przepuszczalności ich ścian dla albumin i powodować obrzęki (Sokołowska i Włodek 2001). Co więcej, nadmierna ekspozycja na NO przyczynia się do uszkodzenia tkanek (nasila apoptozę i nekrozę komórek) oraz może mieć udział w patogenezie chorób z autoagresji (Bruckdorfer 2005). W mikrogleju może dochodzić do nadmiernej ekspresji iNOS, która w konsekwencji prowadzi do destrukcji komórek nerwowych. Najprawdopodobniej mechanizm ten ma udział w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych mózgu takich jak np. choroba Alzheimera, a także w stanach hipoksji tkanki nerwowej (Förstermann i Sessa 2012; Uzbay i Oglesby 2001). Forma mtNOS produkuje tlenek azotu w mitochondriach i uważa się, że reguluje on tam oddychanie komórkowe (Guix i in. 2005). Tlenek azotu wpływa regulująco na perystaltykę układu pokarmowego oraz działa w obrębie układu hormonalnego, a także reguluje kurczliwość i metabolizm mięśni szkieletowych (Prado i in. 2011).

Tlenek azotu może wpływać pozytywnie, ale też negatywnie na przebieg astmy. Produkcja NO przez izoformy konstytutywne powoduje relaksację mięśni gładkich dróg oraz naczyń oddechowych, co zmniejsza nasilenie choroby. Z drugiej strony duża ilość NO produkowana przez syntazę indukowaną powoduje chemotaksję komórek zapalnych, co skutkuje nagromadzeniem eozynofili i limfocytów T w płucach. Ich obecność nasila stan zapalny i objawy choroby (Prado i in. 2011).

NO działa również w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Ze względu na to, iż jest syntezowany w zależności od potrzeb i nie jest magazynowany w zakończeniach synaps, uważa się, iż działa on jako nietypowy neuroprzekaźnik. Co więcej, przez swoją labilność jego stężenie nie poddaje się klasycznym mechanizmom regulacji (wychwyty zwrotny, rozkład enzymatyczny) oraz nie istnieją dla niego receptory w błonie komórkowej (Bruckdorfer 2005; Garthwaite 2008). Tlenek azotu ma udział w kontroli wydzielania szeregu neurotransmiterów takich jak dopamina, noradrenalina, serotonina oraz acetylocholina i glutaminian. Co więcej, NO nasila transmisję GABA-ergiczną (neuroprzekaźnik hamujący) w korze mózgu, prążkowie i hipokampie (Garthwaite 2008). Działanie ośrodkowe NO manifestuje się m.in. w regulacji snu i czuwania, regulacji ośrodka głodu i sytości oraz pobierania wody. Poprzez wpływ na receptory NMDA i wpływ na transmisję glutaminergiczną bierze udział w plastyczności synaptycznej, uczeniu się i zapamiętywaniu. Literatura donosi, iż NO ma udział w procesie odbierania impulsów bólowych. Ma znaczenie w kontroli zachowań seksualnych, aktywności lokomotorycznej oraz w regulacji ciepłoty ciała (Guix i in. 2005; Garthwaite 2008; Sokołowska i Włodek 2001). Literatura wskazuje, iż tlenek azotu ma również udział w mechanizmie działania substancji psychostymulujących (kokaina, amfetamina), rozwoju uzależniania oraz odczuwanie lęku (Uzbay i Oglesby, 2001).

Synteza tlenku azotu w tkance nerwowej zależna jest od obecności jonów wapnia. Aktywacja receptora NMDA powoduje otwarcie bramkowanych napięciem kanałów wapniowych. Uwolnione jony wapnia łącząc się z kalmoduliną pobudzają neuronalną NOS do produkcji NO. Źródłem jonów wapnia mogą być także zapasy zgromadzone w komórkach. Strukturami mózgu, gdzie dochodzi

w dużym stopniu do ekspresji nNOS i w konsekwencji syntezy NO są hipokamp oraz mózdzek (Wiesinger 2001; Vincent 2010).

Mechanizm działania NO na poziomie molekularnym rozpoczyna się od połączenia się go z cytozolem (rozpuszczalną) cyklazą guanylową (sGC – ang. *soluble guanyl cyclase*) uważaną za jego receptor. Tlenek azotu ma powinowactwo do żelaza trójwartościowego które znajduje się w hemie w sGC. sGC aktywowana przyłączeniem się do niej NO powoduje przejście GTP (guanozyno-5'-trifosforan) w cGMP (cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan). cGMP to drugorzędowy przekaźnik wywołujący efekt biologiczny poprzez wpływ na kanały jonowe zależne od cGMP, kinazy białkowe oraz fosfodiesterazy (Bruckdorfer 2005; Zbrojkiewicz i Śliwiński 2016).

Fosfodiesterazy (PDE) to grupa enzymów różniących się od siebie wieloma właściwościami oraz umiejscowieniem odpowiedzialnych za rozkład wiązań fosfodiesterowych, najczęściej w nukleotydach cyklicznych (cAMP - cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan i cGMP). PDE podzielone są na 11 klas, z czego enzymami o powinowactwie przeważającym do cGMP są PDE5, PDE6 i PDE9. PDE5 jest szczególnie swoista dla cGMP i jej niewielka ilość powoduje rozkład nukleotydu. Badania nad tymi enzymami doprowadziły do rozwoju farmakologii. Najbardziej znanymi lekami są inhibitory PDE5, czyli sildenafil, wardenafil, tadalafil - stosowane jako substancje wazodylatoryjne stosowane w leczeniu nadciśnienia płucnego oraz w zaburzeniach erekcji. Obserwuje się również działanie ochronne na układ krwionośny związane z ich działaniem antyagregacyjnym (PDE jest obecna również w płytkach krwi). PDE5 występuje także w tkance tłuszczowej, jednakże rola jaką w niej odgrywa nie jest do końca wyjaśniona. Wiadomo, iż zahamowanie PDE i w konsekwencji wzrost stężenia cGMP wywołuje szereg przemian prowadzących do zmniejszenia ilości tkanki tłuszczowej. W leczeniu wykorzystuje się także inhibitory PDE3 (amrinon, milrinon, cilostazol) i PDE4 (rolipram). cGMP działa również poprzez kinazy białkowe G (PKG) należące do klasy kinaz serynowo-treoninowych. Biorą udział m.in. w rozkurczu mięśni gładkich, w agregacji płytek krwi, podziale komórek oraz w syntezie kwasów nukleinowych. cGMP wpływa także bezpośrednio na kanały jonowe bramkowane cyklicznymi nukleotydami (CNG – ang. *cyclic nucleotide-gated*). Aktywowany kanał przez cząsteczki cGMP bierze udział w przekazywaniu sygnałów w komórce. Znajdują się w wielu organach, w tym w OUN, sercu, płucach i wątrobie (Zbrojkiewicz i Śliwiński 2016).

4. Podsumowanie i wnioski

Przytoczone dane wskazują na olbrzymie znaczenie tlenu azotu w organizmie człowieka. NO działając jako pierwszorzędowy przekaźnik aktywuje sGC, która produkuje cGMP. Uruchamia to kaskadę reakcji i poprzez różne drogi molekularne (fosfodiesterazy, kanały jonowe, kinazy białkowe) wpływa na wiele tkanek w ludzkim organizmie. Jedną z najważniejszych właściwości tlenu azotu jest działanie w obrębie układu krwionośnego, czyli jego zdolność do rozkurczu mięśniówki naczyni krwionośnych i tym samym obniżanie ciśnienia krwi. NO odgrywa również olbrzymią rolę w odpowiedzi immunologicznej – cytokiny prozapalne oraz lipopolisacharyd bakteryjny pobudzają indukowaną syntazę tlenu azotu do produkcji jego dużych ilości, które są toksyczne dla patogenu. Substancja ta jest także uznawana za nietypowy neuroprzekaźnik w OUN. Bierze udział w regulacji wydzielania innych neurotransmiterów oraz ma znaczenie w rozwoju uzależnień od substancji psychoaktywnych. Tlenek azotu odgrywa rolę nie tylko w fizjologii, ale także w procesach patologicznych. Łączy się go m.in. z chorobami neurodegeneracyjnymi oraz autoimmunologicznymi. Odkrycie jakie role pełni tlenek azotu w ludzkim organizmie pociągnął za sobą rozwój farmakoterapii, w tym wprowadzono na rynek grupę inhibitorów fosfodiesterazy 5. Najśłynniejszym jej przedstawicielem jest sildenafil stosowany w nadciśnieniu płucnym oraz w zaburzeniach erekcji.

Obszerna literatura na temat tlenu azotu ukazuje duże zainteresowanie tematem badaczy, zarówno w kontekście fizjologicznego wpływu tlenu azotu na organizm człowieka, ale także jego udziału w mechanizmie występowania chorób. Co więcej, szlak L-arginina:NO:cGMP i kolejne cele molekularne na które oddziałuje cGMP są bogate w potencjalne punkty uchwytu dla nowych leków. W związku z tym w ciągu najbliższych lat można spodziewać się pojawienia nowych terapii chorób w których patogenezie udział ma tlenek azotu. Bardzo pożądanym byłoby pojawienie się leków

uderzających w choroby neurodegeneracyjne, które w dalszym ciągu nie są skutecznie leczone oraz pojawienie się leków wspierających wychodzenie z uzależnienia.

5. Literatura

- Bruckdorfer R (2005) The basics about nitric oxide. *Molecular Aspects of Medicine* 26: 3-31.
- Förstermann U, Sessa WC (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal* 33(7): 829-837.
- Furchgott RF (1988) Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis in inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. W: Vanhoutte PM (Red.) *Vasodilatation: Vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium.* (s.401-414) New York: Raven Press.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.
- Garthwaite J (2008) Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *European Journal of Neuroscience*, 27: 2783–2802.
- Guix FX, Uribealago I, Coma M et al. (2005) The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology* 76: 126-152.
- Kröncke K-D, Kolb-Bachofen V, Berschick B et al. (1991) Activated macrophages kill pancreatic syngeneic islet cells via arginine-dependent nitric oxide generation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175(3): 752-758.
- Prado CM, Martins MA, Tibério IFLC (2011) Nitric oxide in asthma pathophysiology. *ISRN Allergy* 2011.
- Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS (2007) Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 15: 252-259.
- Shaul PW (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annual Review of Physiology* 64: 749-774.
- Simon B, Moody E, Johns A (2007) Gazy terapeutyczne. W: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL (Red): *Farmakologia Goodmana i Gilmana t. I* (s. 403-416), Lublin: Wydawnictwo Czelej.
- Sokołowska M, Włodek (2001) Dobre i złe strony tlenku azotu. *Folia Cardiologica* 8(5): 467-477.
- Ścibor D, Czeczot H (2005) Arginina – metabolizm i funkcje w układzie sercowo–naczyniowym. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* 14(5): 1041-1050.
- The Nobel Assembly at Karolinska Institutet (1998) Press release. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1998, <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1998/press-release/> (dostęp: 15.01.2020).
- Uzbay TI, Oglesby MW (2001) Nitric oxide and substance dependence. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 25: 43-52.
- Wiesinger H (2001) Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 64(4): 365-91.
- Vincent SR (2010) Nitric oxide neurons and neurotransmission. *Progress in Neurobiology* 90:246-255.
- Zbrojkiewicz M, Śliwiński L (2016) Cykliczny guanozynomonofosforan w regulacji czynności komórki. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 70: 1276-1285.
- Zhou L, Zhu D-Y (2009) Neuronal nitric oxide synthase: Structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20: 223-230.

5. Grelina – hormon działający plejotropowo

Ghrelin - a Pleiotropic Hormone

Marta Czajkowska

Katedra Fizjologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

opiekun naukowy: prof. dr hab. Jarosław Całka

Marta Czajkowska: marta.czajkowska@uwm.edu.pl

Słowa kluczowe: grelina; wielokierunkowe działanie; hormon wzrostu

Streszczenie

Grelina jest hormonem polipeptydowym wykazującym wielokierunkową aktywność. Obecnie udowodniono, że pobudza syntezę hormonu wzrostu, prolaktyny. Należy do związków regulujących funkcje metabolizmu organizmu. Grelina stymuluje apetyt, z tego powodu często nazywany jest „hormonem głodu”. Ponadto pobudza motorykę żołądka oraz wpływa na właściwości wydzielnicze trzustki. Oprócz tego wykazano wpływ greliny na pracę układu krążenia, osteogenezę oraz procesy reprodukcyjne. Ma działanie przeciwzapalne oraz moduluje układ immunologiczny. Udokumentowano dodatkowo, jej udział w procesach zapamiętywania. Produkcja greliny w organizmie zachodzi przede wszystkim w komórkach błony śluzowej układu pokarmowego.

1. Wstęp

Grelina została po raz pierwszy wyizolowana przez japońskich naukowców w 1999 roku z komórek błony śluzowej żołądka szczura (Kojima i in. 1999). Jest to peptyd składający się z 28 reszt aminokwasowych, a jego masa cząsteczkowa wynosi 3315 Da. Powstaje z 117-aminokwasowego prekursora – preprogreliny. Prekursor greliny jest kodowany przez gen ghrl. Jego obecność stwierdzono u wszystkich ssaków, a u człowieka znajduje się on na chromosomie trzecim (Lee i in. 2002).

2. Przegląd literatury

Do niedawna sądzono, że grelina jest jedynie syntetyzowana w przewodzie pokarmowym i z tego względu była zaliczana do hormonów żołądkowo-jelitowych. Obecnie wiadomo, że grelina wykazuje wielokierunkową aktywność. Działa endokrynnie oraz parakrynnie. Wykazano, że odpowiada za uwalnianie prolaktyny, adrenokortykotropiny, hormonu luteinizującego. Bierze udział w regulacji steroidogenezy i metabolizmu węglowodanów. Wpływa na pracę trzustki oraz układu krążenia, wykazując działanie inotropowo dodatnie i wazodylacyjne. W przewodzie pokarmowym, grelina nasila motorykę żołądka oraz stymuluje wydzielanie kwasu żołądkowego. Odpowiada za prawidłowe zachowanie fizjologicznego stanu snu i czuwania. Wykazano, że hamuje również proliferację niektórych linii nowotworowych oraz reguluje działanie układu odpornościowego (Barreiro i in. 2002).

Grelina jest głównie syntetyzowana w komórkach błony śluzowej układu pokarmowego. Jej najwyższe stężenie stwierdza się w obrębie dna i trzonu żołądka (Lee i in. 2002). Nie jest wydzielana do światła przewodu pokarmowego. Hormon ulega wydzielaniu wewnętrznemu do naczyń krwionośnych. Sugeruje się, że nawet 80% hormonu jest wytwarzane w żołądku, a po zabiegu gastrektomii, stężenie greliny w osoczu ulega znacznemu spadkowi (Kojima i in. 1999). Mniejsze ilości są wydzielane przez jądro łukowate podwzgórza, przysadkę mózgową, komórki układu immunologicznego, w płucach, nerkach, gruczole sutkowym, gonadach, korze nadnerczy, kardiomiocytach i w trzustce. Występuje także w hepatocytach oraz w komórkach cytotrofoblastu łożyska ludzkiego w pierwszym trymestrze ciąży. Jej obecność została stwierdzona także w tkankach nowotworowych, m.in. w guzach płuc, rakach tarczycy, gruczolakach przysadki (Kojima i in. 1999;

Barreiro i in. 2002). Istnieją również doniesienia wskazujące na obecność przypadków pacjentów z guzami neuroendokrynnymi, o wyjątkowo dużej ekspresji greliny, tzw. ghrelinoma (Kojima i in. 1999).

Na wydzielanie hormonu wzrostu (GH) wpływają dwa antagonistyczne hormony podwzgórza: somatoliberyna (GHRH, *growth hormone releasing hormone*) oraz somatostatyna. Działają one poprzez receptor GHRH-R znajdujący się w przednim płacie przysadki. Na uwalnianie GH wpływają również tyroksyna, glikokortykosteroidy, hormony płciowe, wolne kwasy tłuszczowe oraz niektóre aminokwasy (Hattori i in. 2001). Grelina jest pierwszym opisanym hormonem pobudzającym wydzielanie hormonu wzrostu, należącym do związków GHS, czyli *growth hormone secretagogues*, które nie wykazują swojej aktywności poprzez receptor GHRH-R. Grelina, a także inne związki zaliczne do GHS, łączą się z receptorem GHS-R poprzez fosfolipazę C. Powoduje to wytworzenie po wewnętrznej stronie błony komórkowej inozytolotrifosforanu i diacyloglicerolu. Powstałe związki inicjują przepływ jonów wapniowych z siateczki śródplazmatycznej do cytoplazmy, co aktywuje kinazę białkową. Dochodzi do zwiększenia metabolizmu komórkowego (Howard i in. 1996). Grelina poprzez powiązanie z receptorem GHS-R, wzmacnia wydzielanie hormonu wzrostu. Jest wytwarzana miejscowo w jądrze łukowatym podwzgórza, dzięki czemu stymuluje transport GHRH do przedniego płata przysadki. Według badań Inui i współ. z 2001 roku, podanie egzogennej greliny razem z GHRH powoduje wzrost sekrecji hormonu wzrostu. W przypadku aplikacji antagonistów GHRH oraz przeciwciał anti-GHRH wykazano zmniejszenie syntezy stymulowanego greliną GH. Somatoliberyna reguluje więc nie tylko wydzielanie hormonu wzrostu, ale również greliny. Bowers udowodnił, że grelina silniej stymuluje produkcję GH niż GHRH (Bowers, 2001). Wykazano również, że już po 10 minutach od podania dożylnego greliny w dawce 10 µg u szczurów następował wzrost stężenia hormonu wzrostu. Jej okres półtrwania wynosi 30 minut (Tolle i in. 2002).

Na uwalnianie greliny w organizmie mają wpływ czynniki związane ze sposobem życia. Jest związana z uwalnianiem kortykotropiny. W badaniach wykonanych na szczurach, iniekcja greliny do komór mózgowych wywołała pojawienie się objawów stresowych oraz stymulowała zachowania podobne do leku. Działanie greliny jest związane z uwalnianiem kortykotropiny (Adams i in. 2011). Dożylne podanie greliny pochodzenia ludzkiego powodowało wzrost stężenia ACTH i kortyzolu, a także powiększenie komórek przedniego płata przysadki odpowiedzialnych za wydzielanie hormonu adrenokortykotropowego (Stevanovic i in. 2007). Badania wykonane przez Fujitsukę i współ. w 2009 roku wykazały, że podanie selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI) stosowanych w celu zmniejszenia lęku, powodowało zmniejszenie poziomu greliny za pośrednictwem receptora 5-HT_{2c}. Wyniki te sugerują, iż leki, działające poprzez ten receptor mogą specyficznie redukować stężenie greliny. Wykazano również, że grelina może regulować wydzielanie prolaktyny. (Fujitsuka i in. 2009).

W procesie stymulacji uwalniania greliny ważną rolę przypisuje się hipoglikemii i leptynie. Wzmoczone wydzielanie greliny występuje także podczas wyniszczenia organizmu oraz przy stosowaniu diety redukcyjnej. Hamujący wpływ na syntezę tego hormonu ma hiperglikemia, hiperinsulinemia, otyłość oraz uczucie sytości (Adams i in. 2011). Zauważono, że u osób z silnymi niedoborami energetycznymi, poziom greliny w organizmie jest znacznie wyższy niż u prawidłowo odżywionych pacjentów. W związku z tym przypuszcza się, że grelina bierze udział w rozwoju jadłowstrętu psychicznego. Z drugiej strony, znacznie niższe stężenia greliny można zauważyć u osób z nadwagą wraz ze zmniejszeniem poziomu hormonu wzrostu.

2.1 Wpływ greliny na funkcje układu pokarmowego

W przewodzie pokarmowym, grelina odpowiada za przyspieszenie perystaltyki żołądka i jelit oraz za wzmoczoną sekrecję soku żołądkowego i gastryny. Grelina, oddziałując na nerw błędny oraz na enteryczne zwoje jelitowe powoduje zwiększenie amplitudy i częstotliwości skurczów żołądka. Co ciekawe, hormon ten nasila proliferację adipocytów oraz hepatocytów w skutek replikacji genetycznej (Futagami i in. 2011). Odnotowano, że u pacjentów z neurogennym porażeniem motoryki żołądka, grelina zmniejszała dolegliwości takie jak zgaga, nudności i wymioty, poposiłkowe poczucie

pełności. U pacjentów ze stwierdzonymi żołądkowymi polipami hiperplastycznymi można zauważyć zmniejszenie poziomu greliny w porównaniu do osób zdrowych. (Ersoy i in. 2012).

W układzie pokarmowym, stwierdzono cytoprotekcyjne właściwości greliny w odpowiedzi na czynniki chemiczne (75% etanol) oraz fizyczne (zimno) w obrębie komórek błony śluzowej jelit. Podanie hormonu zmniejsza stopień uszkodzenia błony śluzowej. Na obrzeżach owrzodzeń żołądka dochodzi do syntezy greliny, a podanie jej egzogennie nasila proces gojenia błony śluzowej żołądka. Dzieje się tak, ponieważ grelina aktywuje wydzielanie prostaglandyn PGE₂, tlenku azotu przy jednoczesnym hamowaniu czynników prozapalnych (IL-6, TNF- α) (Lundholm i in. 2010).

Według badań Lundholma i współ. grelina wykazuje działanie terapeutyczne w pacjentów onkologicznych. U chorych cierpiących na nowotwór przewodu pokarmowego w zaawansowanym stadium, podawanie podskórne greliny spowodowało poprawę metabolizmu. Podejrzewa się, że doszło do redukcji zespołu kacheksja – anoreksja, czyli stanu zapalnego towarzyszącego nowotworzeniu, przy którym obserwuje się wzrost poziomu cytokin prozapalnych, utratę mięśniową oraz wzmożony metabolizm tłuszczów, białek i cukrów (Lundholm i in. 2010).

2.2 Wpływ greliny na funkcje układu rozrodczego

W męskim układzie rozrodczym, synteza greliny zachodzi w komórkach Leydiga i Sertoliego. Zauważono, że stężenie hormonu u mężczyzn jest mniejsze niż u kobiet, a wraz z wiekiem zmniejsza się jądrowa synteza greliny. W męskim układzie płciowym grelina kontroluje syntezę hormonów steroidowych, hamuje wydzielanie testosteronu w komórkach Leydiga, a także bierze udział w kontroli funkcji kanalików nasiennych (Barreiro i in. 2003).

U kobiet grelina jest wytwarzana przez komórki łożyskowe, pęcherzyka jajnikowego oraz ciała żółtego. W zależności od fazy cyklu płciowego oraz trwania ciąży obserwuje się wahania poziomu hormonu. Najwyższe stężenia greliny zanotowano w fazie lutealnej oraz w początkowych etapach ciąży. Tak samo jak w jądrach, grelina w jajnikach wpływa również na steroidogenezę. Hormon odpowiada za regulację zmian zachodzących w warstwie czynnościowej śluzówki macicy pod wpływem implantującej się blastocysty. Najwyższe stężenia greliny są widoczne w momencie inplantacji zarodkowej, a najniższe są osiągnięte w fazie krwawienia. Grelina, za pośrednictwem GH wykazuje wzrost intensywności procesu decidualizacji (Tawadros i in. 2007).

2.3 Wpływ greliny na fizjologię serca i układu krwionośnego

W przypadku układu krążenia, grelina jest hormonem działającym wielokierunkowo. Powoduje wzrost frakcji komorowej serca oraz zwiększenie masy lewej komory, przy czym częstość akcji serca pozostaje bez zmian. Poprzez oddziaływanie na komórki mięśni gładkich oraz śródbłonek, wywołuje obniżenie ciśnienia tętniczego krwi. Efekt ten może być również wynikiem przenikania greliny przez barierę krew-mózg oraz oddziaływaniem na neurony jądra pasma samotnego. Działanie powodujące obniżenie ciśnienia krwi w wyniku aktywności greliny, jest związane ze wzrostem produkcji w śródbłonku syntazy tlenku azotu (eNOS). Enzym ten odpowiada za produkcję tlenku azotu, który uważany jest za związek najsilniej obniżający ciśnienie krwi (Michalski i in. 2008).

Grelina modyfikuje szlaki apoptyczne komórek, co wiąże się z jej działaniem kardioprotekcyjnym. Jednocześnie hormon poprawia metabolizm energetyczny komórek. W przypadku osób z ostrym zawałem mięśnia sercowego, zauważono istotne zmniejszenie poziomu greliny we krwi. Stężenie hormonu jest związane ze stopniem uszkodzenia narządu oraz spadkiem jego wydolności. Co więcej, grelina może mieć właściwości przeciwartymiczne (Michalski i in. 2008). Udowodniono również rolę hormonu w redukcji nadmiernego pobudzenia rytmu serca wywołanego adrenaliną. Grelina indukuje syntezę VEGF (czynnika wzrostu naczyniowego), który bierze udział w procesie angiogenezy pozawałowej serca. Ochronne działanie greliny zostało również udowodnione u pacjentów z zespołem poperfuzyjnym serca, gdzie hormon wykazywał działanie ochronne i protekcyjne (Chang i in. 2004).

2.4 Wpływ greliny na układ kostny i chrzęstny

Grelina wpływa na tkankę kostną bezpośrednio poprzez aktywację osteocytów oraz chondrocytów, co skutkuje wzmożonym metabolizmem komórek. Jednocześnie w sposób pośredni poprzez nasiloną syntezę hormonu wzrostu również stymuluje rozwój układu kostno-chrzęstnego

(Cassoni i in. 2001). Hormon powoduje wzmożoną proliferację oraz różnicowanie osteoblastów. Wywołuje nasilenie chondrocytarnej produkcji kwasu hialuronowego i proteoglikanów jako skutek wzrostu produkcji cAMP. Wzmaga syntezę fosfatazy zasadowej w osteocytach, która bierze udział w procesie mineralizacji kości (Nikolopoulos i in. 2010).

Najnowsze doniesienia wskazują, że grelina hamuje pobieranie kwasów tłuszczowych przez chondrocyty. To z kolei powoduje zmniejszenie ilości dostępnego kwasu arachidonowego, który jest prekursorem w syntezie prostaglandyn i leukotrienów. Związków pośrednich w rozwoju stanu zapalnego. Sugeruje się, że grelina w przyszłości może mieć zastosowanie jako nowy lek przeciwzapalny w terapii schorzeń kości i stawów (Nikolopoulos i in. 2010).

2.5 Wpływ greliny na pamięć oraz regulację rytmu snu i czuwania

Grelina wpływa pozytywnie na procesy pamięciowe i uczenia się. Wykazano, że w strukturach nerwowych mózgu szczura takich jak ciało migdałowate, hipokamp, jądro grzbietowe szwu, występują liczne receptory dla greliny. Ponadto, wstrzyknięcie hormonu bezpośrednio do wnętrza jądra grzbietowego szwu, komór mózgu, a także ogólnoustrojowo wywołuje proces retencji pamięci u gryzoni (Davis i in. 2011). U myszy pozbawionych receptora GHS-R zauważono silny deficyt pamięci przestrzennej. Świadczy o tym doświadczenie Davisa i współ. w którym to po ulokowaniu zwierząt bez receptora dla greliny w basenie, nie były one w stanie w odpowiednim czasie dotrzeć do platformy znajdującej się około 1 cm poniżej tafli wody. Można przypuszczać, że w hipokampie hormon ten jest odpowiedzialny za intensyfikację powstawania nowych połączeń nerwowych (Davis i in. 2011).

U pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera można zanotować wysokie wahania stężenia greliny w ośrodkowym układzie nerwowym. Sugeruje się, że grelina jest odpowiedzialna za modyfikacje funkcji poznawczych, a zmiany jej poziomu mogą być związane z rozwojem schorzenia lub nasileniem jego objawów (Chen i in. 2009).

Grelina, poprzez modyfikację neuronów jądra nakrywkowego boczno-grzbietowego, bierze udział w regulacji procesu snu i czuwania oraz rytmu dobowego. Dochodzi do zmniejszenia poziomu jonów potasowych w tej części ośrodkowego układu nerwowego. Podczas snu, stężenie greliny ulega wzrostowi, a w momencie wybudzenia osiąga mniejsze wartości (Chen i in. 2009). Tej zależności nie zauważono u osób mających problemy ze snem, śpiących niewystarczająco długo. Co ciekawe, ci pacjenci wykazywali wzrost apetytu. Sugeruje się więc, że istnieje zależność między jakością snu, a predyspozycjami do nadwagi i otyłości, co ma bezpośredni związek z wahaniami poziomu greliny. U osób skarżących się na bezsenność, wykazano wyższe stężenia greliny we krwi (Chen i in. 2009).

3. Wnioski

Grelina jest hormonem odpowiadającym za regulację procesów metabolicznych w organizmie. Działa zarówno na poziomie komórkowym jak i ogólnoustrojowym, co czyni ją ważnym hormonem biorącym udział w funkcjonowaniu ustroju. Jest odpowiedzialna za modulację łaknienia. Dodatkowo, reguluje stężenia innych hormonów. Wpływa na procesy rozmnażania, pobudza kościotworzenie oraz wywiera efekt przeciwzapalny. Udowodniono jej protekcyjne działanie na układ pokarmowy i krążenia. To pozwala stwierdzić, że grelina jest związkiem działającym plejotropowo. Z tego powodu istnieje wielka potrzeba kontynuowania badań dotyczących działania tego hormonu, co w przyszłości może być wykorzystane do opracowania nowych terapii leczenia stanów chorobowych organizmu.

4. Literatura

- Adams CE, Greenway FL, Brantley PJ (2011) Lifestyle factors and ghrelin: critical review and implications for weight loss maintenance. *Obes Rev.* 12(5):e211-8.
- Barreiro ML, Gaytán F, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Diéguez C, Tena-Sempere M (2002) Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod.* 67(6):1768-76.

- Barreiro ML, Suominen JS, Gaytán F, Pinilla L, Chopin LK, Casanueva FF, Diéguez C, Aguilar E, Toppari J, Tena-Sempere M (2003) Developmental, stage-specific, and hormonally regulated expression of growth hormone secretagogue receptor messenger RNA in rat testis. *Biol Reprod.* May;68(5):1631-40
- Bowers CY (2001) Unnatural growth hormone-releasing peptide begets natural ghrelin. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(4):1464-9.
- Chang L, Ren Y, Liu X, Li WG, Yang J, Geng B, Weintraub NL, Tang C (2004) Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* Feb;43(2):165-70.
- Chen CY, Asakawa A, Fujimiya M, Lee SD, Inui A (2009) Ghrelin gene products and the regulation of food intake and gut motility. *Pharmacol Rev.* Dec;61(4):430-81
- Davis JF, Choi DL, Clegg DJ, Benoit SC (2011) Signaling through the ghrelin receptor modulates hippocampal function and meal anticipation in mice. *Physiol Behav.* Apr 18;103(1):39-43
- Ersoy O, Ersoy R, Akin E, Demirezer A, Büyükaşık S, Selvi E, Çakır B (2012) Evaluation of serum ghrelin levels in patients with hyperplastic gastric polyps. *Turk J Gastroenterol.*;23(5):444-7.
- Fujitsuka N, Asakawa A, Hayashi M, Sameshima M, Amitani H, Kojima S, Fujimiya M, Inui A (2009) Selective serotonin reuptake inhibitors modify physiological gastrointestinal motor activities via 5-HT_{2c} receptor and acyl ghrelin. *Biol Psychiatry.* 65: 748–759.
- Futagami S, Shimpuku M, Yin Y, Shindo T, Kodaka Y, Nagoya H, Nakazawa S, Fujimoto M, Izumi N, Ohishi N, Kawagoe T, Horie A, Iwakiri K, Sakamoto C (2011) Pathophysiology of functional dyspepsia. *J Nippon Med Sch.*;78(5):280-5.
- Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C (2001) GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab.* 86(9):4284-91.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C et al. (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science.* 273(5277):974-7.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 402(6762):656-60.
- Lee HM, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH Jr. (2002) Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology.* 143(1):185-90.
- Lundholm K, Gunnebo L, Körner U, Iresjö BM, Engström C, Hyltander A, Smedh U, Bosaeus I (2010) Effects by daily long term provision of ghrelin to unselected weight-losing cancer patients: a randomized double-blind study. *Cancer.* Apr 15;116(8):2044-52
- Michalski B, Krzemińska-Pakuła M, Kasprzak JD (2008) Przez żołądek do serca – znaczenie greliny w patogenezie schorzeń układu krążenia. *Kardiol Pol;* 66, 564-568
- Nikolopoulos D, Theocharis S, Kouraklis G (2010) Ghrelin, another factor affecting bone metabolism. *Med Sci Monit.* Jul;16(7):RA147-62. Review.
- Stevanovic D, Milosevic V, Starcevic VP, Severs WB (2007) The effect of centrally administered ghrelin on pituitary ACTH cells and circulating ACTH and corticosterone in rats. *Life Sci.* 80: 867–872.
- Tawadros N, Salamonsen LA, Dimitriadis E, Chen C (2007) Facilitation of decidualization by locally produced ghrelin in the human endometrium. *Mol Hum Reprod.* Jul;13(7):483-9.
- Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT (2002) Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology.* 143(4):1353-61.

6. Mechanizm działania kofeiny i jej wpływ na organizm

The mechanism of action of caffeine and its effect on the body

Marta Czajkowska

Katedra Fizjologii Klinicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Jarosław Całka

Marta Czajkowska: marta.czajkowska@uwm.edu.pl

Słowa kluczowe: teina, mechanizm działania, kofeina

Streszczenie

Kofeina jest związkami regularnie spożywanym przez większość populacji. Jej źródłem jest głównie kawa i herbata. Oddziaływanie kofeiny na organizm polega przede wszystkim na pobudzeniu ośrodkowego układu nerwowego. Jest ona uważana za najczęściej spożywaną substancję psychoaktywną. Działanie fizjologiczne kofeiny powoduje duże zainteresowanie jej wpływem na zdrowie, zwłaszcza w odniesieniu do ryzyka chorób sercowo naczyniowych. W organizmie kobiet ciężarnych metabolizm kofeiny jest trzykrotnie wydłużony, a kofeina i jej metabolity swobodnie przechodzą przez barierę łożyskową do płodu. Z tego powodu kobietom w okresie ciąży zaleca się ograniczenie spożycia kofeiny. Kontrola ilości kofeiny zalecana jest także w diecie u osób starszych, a także u dzieci i młodzieży, przede wszystkim z uwagi na jej oddziaływanie na ośrodkowy układ nerwowy. Kofeina ma udział w regulacji gospodarki wapniowej organizmu i czasu snu. Średnie spożycie kofeiny w krajach europejskich kształtuje się w granicach 280–490 mg dziennie.

1. Wstęp

Kofeina (metylteobromina, teina, guaranina, 7-metyloteofilina) występująca pod postacią białego krystalicznego proszku, jest zaliczana do grupy alkaloidów purynowych. Jest substancją o gorzkim smaku, bezwonną, która dość ciężko rozpuszcza się w wodzie oraz w rozpuszczalnikach organicznych. W warunkach naturalnych obecność kofeiny wykazano w liściach krzewu herbacianego, nasionach kawy, kakao czy ostrokrzewu paragwajskiego Mate. Najpowszechniej występuje w postaci czekolady, kawy i herbaty. Kofeina jest uznawana za najbardziej popularną psychoaktywną substancję na świecie (Wierzejska i Jarosz 2003).

Kofeina jest pozyskiwana syntetycznie lub z surowców pochodzenia roślinnego. Zawartość tego alkaloidu w nasionach kawy sięga do 2,5%, w liściach herbaty do 4,5%, a w przypadku liści ostrokrzewu paragwajskiego Mate do 1,8% (Andrews i in. 2007). Mimo tego, że w liściach herbaty stężenie kofeiny jest wyższe niż w ziarnach kawy, to po sporządzeniu naparu, zawartość kofeiny w herbacie maleje. Jest to spowodowane obecnością garbników katechinowych, uwalnianych podczas przygotowania napoju.

Zawartość kofeiny w herbacie w dużym stopniu zależy od sposobu jej przygotowania, odmiany, warunków uprawy. Herbata czarna zawiera od 2,8 do 3,8 g teiny na 100 g, podczas gdy w zielonej herbacie jest jej dwukrotnie mniej. Szacuje się, że 160 ml czarnej herbaty zawiera do 50 mg kofeiny. W przypadku kawy, ilość kofeiny jest również uwarunkowana od gatunku ziaren i sposobu przygotowania. W Arabica znajduje się dwukrotnie mniej kofeiny niż w przypadku odmiany Robusta. Uważa się, że 150 ml kawy z ekspresu sporządzonej z jednej łyżeczki kawy zawiera około 27 mg kofeiny (Wierzejska i Jarosz 2003).

2. Wchłanianie

Kofeina jest wchłaniana z przewodu pokarmowego w sposób prawie całkowity, a jej dostępność biologiczna sięga 100%. Przenika przez barierę śluzową żołądka i w 90% rozprzodza

się po całym organizmie w postaci niezdysonansowanej. Powinowactwo do teiny w dużym stopniu zależy od poziomu uwodnienia oraz od jej stężenia we krwi (Dworzański i in. 2009).

Maksymalne poziomy kofeiny w organizmie są odnotowane po 40 min od jej spożycia. Co ciekawe, jej stężenie w mózgu i płynie rdzeniowym jest porównywalne do wartości substancji w osoczu. Na jej właściwości farmakokinetyczne mają wpływ wiek, ciąża, przyjmowane leki i uwarunkowania genetyczne.

3. Dystrybucja i metabolizm kofeiny

Kofeina jest rozprowadzana po całym organizmie i w 30 % wiąże się z białkami osocza. Z uwagi na lipofilowy charakter substancji, z łatwością przenika ona przez wszystkie błony biologiczne, w tym barierę krew-mózg. Przedostaje się do mleka, łożyska i do płynu owodniowego (Dworzański i in. 2009).

Biotransformacja teiny zachodzi w większości w wątrobie, i jedynie 2% przyjętej substancji jest uwalniana z moczem w formie niezmienionej. Szlak metaboliczny teiny uwzględnia syntezę trzech głównych związków – paraksantyny, teofiliny i teobrominy, które powstają w komórkach wątroby przy udziale cytochromu P450 1A2 (Janus 1993). Metabolizm paraksantyny zachodzi w dwóch procesach przebiegających w tym samym czasie. Wytwarza się 8-hydroksyparaksantyna oraz w wyniku demetylacji dochodzi do syntezy kwasu 1-me-tylomoczowego, 1-metyloksantyny i 5-acetyloamino-6-formyloamino-1-metyloouracylu. Związki te są transportowane do układu moczowego, a ich stężenie jest pomocne w określeniu szybkości metabolizmu teiny (Janus 1993).

Wydalenie kofeiny zachodzi poprzez nerki i określa się, że jej okres biologicznego półtrwania wynosi 3-5 godzin, przy czym biorąc pod uwagę różnice osobnicze, czas ten może wydłużyć się do 10 godzin (Wierzejska i Jarosz 2003). U kobiet okres półtrwania jest o 30% krótszy. Wydłużenie czasu biofarmacji kofeiny występuje u osób cierpiących na schorzenia wątroby, u kobiet przyjmujących leki antykoncepcyjne, u noworodków oraz w okresie ciąży. Udowodniono, że podczas pierwszego trymestru ciąży, metabolizm kofeiny jest na stałym poziomie, a w 17. tygodniu, okres półtrwania związku wzrasta do 10 godzin. Co ciekawe, pod koniec ciąży czas procesu biotransformacji związku może trwać nawet do 18 godzin (Grosso i Bracken 2005). U noworodków wydłużony okres półtrwania kofeiny jest spowodowany niewykształconym w pełni mechanizmem przekształcania teiny oraz niewielką aktywnością cytochromu P450.

4. Mechanizm działania kofeiny

Kofeina zaliczana jest to grupy antagonistów nieselektywnych receptorów A1 i A2 dla adenozyiny. Pod względem strukturalnym, kofeina jest podobna do adenozyiny. W małych dawka blokuje ona swoiste receptory, co w konsekwencji powoduje wzmożoną aktywność ośrodkowego układu nerwowego. Z uwagi na to, że kofeina jest inhibitorem cykazy adenylnowej, dochodzi do wzrostu stężenia cAMP w komórce (Zhang 2001). Zahamowanie receptora A1 w konsekwencji powoduje nasilenie uwalniania neuroprzekaźników – acetylocholiny, dopaminy i noradrenaliny oraz pobudzenie organizmu. Zauważa się przyspieszenie akcji serca, a naczynia krwionośne są rozszerzone (Tanda i Goldberg 2000). Działanie antagonistyczne na receptor A2A wywołuje zwiększoną aktywność dopaminy oraz jej mocniejsze połączenie z receptorem D2. W wyniku tego działania dochodzi do stymulacji układu nerwowego. Receptor adenozyinowy A2A występuje na obszarze opuszki węchowej, w jądrze półleżącym oraz w prądkowiu (Tanda i Goldberg 2000). Odwrotnie jak w przypadku receptora A1, zahamowanie receptora A2A, wywołuje obniżenie stężenia cAMP.

Po spożyciu kofeiny w stężeniach od 0,1 do 1 mM, dochodzi do inhibicji fosfodiesterazy, która odpowiada za konwersję cAMP do formy niecyklicznej, co wywołuje wzrost cyklicznego cAMP i nagromadzenie związku w komórkach. W wyniku tego działania dochodzi do osłabienia czynności komórek zapalnych, wzmożenie sekrecji soku żołądkowego oraz do rozkurczu komórek mięśni gładkich. Kofeina dostarcza energię komórkową w wyniku pobudzenia mechanizmów degradacji lipidów i glikogenu (Fiebich i in. 2000).

5. Toksyczność kofeiny

Uważa się, że kofeina jest związkiem o niewielkiej toksyczności, ze względu na szybką eliminację związku z organizmu. W dawce przekraczającej 1 g, kofeina wywołuje pojawienie się skurczy mięśni twarzy i kończyn. Obserwuje się rozdrażnienie, bezsenność i niepokój. Zauważyć można także przyspieszenie oddechu, zaburzenia rytmu serca i objawy ze strony przewodu pokarmowego. Spożycie kawy w ilości od 3 do 5 g wywołuje pobudzenie ośrodkowego układu nerwowego, co często objawia się wystąpieniem drgawek. Określa się, że dawka śmiertelna kofeiny wynosi co najmniej 6,5 g (Wielosz i Kleinrok 1996).

Objawy toksyczności u dzieci dotyczą pobudzenia centralnego układu nerwowego, wzmożonej diurezy, tachykardii i wymiotów. Przewlekłe narażenie na niekorzystne działanie kofeiny może powodować schorzenia nerek, mięśni i przewodu pokarmowego (Nawrot i in. 2003).

Regularne przyjmowanie kofeiny powoduje wystąpienie tolerancji, co utożsamiane jest z uzależnieniem. U dorosłych spożywających kofeinę (od 300 do 1000 mg dziennie) przez okres pięciu dni zauważyć można zmniejszenie rytmu sercowego. Tolerancja jest utracona po krótkim czasie odstawienia substancji. Mechanizm powstawania tolerancji nie jest w pełni wyjaśniony. Przypuszcza się, że jest ona związana z rozwojem zmian w receptorach dopaminowych w wyniku ciągłej blokady receptorów adenozynowych. U ludzi dochodzi również do fizjologicznej tolerancji na zmiany ciśnienia i rytmu serca wywołane kofeiną. Każdorazowe spożycie substancji wywołuje stymulację układu nerwowego, przede wszystkim struktur odpowiedzialnych za funkcje motoryczne oraz procesy snu i czuwania (Nehlig 1999).

6. Wpływ kofeiny na układ krążenia

Kofeina działa stymulująco na autonomiczny układ nerwowy. W wyniku działania antagonistycznego na układ adenozyny, kofeina wywołuje pobudzenie uwalniania noradrenaliny, co w konsekwencji powoduje wzrost częstości akcji serca i jego kurczliwości. Wzmaga również napięcie sercowe oraz wpływa na zwiększenie objętości minutowej serca (Nawrot i in. 2003).

W wyniku działania kofeiny odnotowano wzrost ciśnienia skurczowego średnio o 5-15 mm Hg lub rozkurczowego o 5-10 mm Hg. Najwyraźniejszy wzrost zauważono po spożyciu ponad 250 mg kofeiny, zarówno u kobiet jak i mężczyzn, w każdym wieku, bez względu na wartość ciśnienia początkowego. Po okresie od 1 do 3 dni widoczna jest tolerancja na zmiany ciśnienia wynikające ze spożycia teiny (Nawrot i in. 2003).

Wpływ kofeiny na naczynia krwionośne jest zależny od początkowego stężenia adenozyny. Przy zwiększonym stężeniu adenozyny, w wyniku blokowania receptora A₂, dochodzi do zwężenia obwodowych naczyń krwionośnych. Rozszerzenie naczyń jest obserwowane w przypadku prawidłowego poziomu adenozyny, co jest spowodowane bezpośrednim działaniem miolitycznym. Kofeina wywołuje rozszerzenie naczyń wieńcowych, skórnych i nerkowych, a kurczy naczynia mózgowie, co tłumaczy udział związku w leczeniu bólów głowy. W wyższych dawkach kofeina stymuluje ośrodek naczynioruchowy, co wywołuje skurcz naczyń w obrębie jamy brzusznej (Wielosz i Kleinrok 1996).

W ostatnich latach udowodniono, że kofeina zawarta w kawie przyczynia się do wzrostu poziomu cholesterolu we krwi. Efekt ten jest związany z obecnością diterpenów (kafestol, kahweol), do uwalniania których dochodzi podczas parzenia kawy „po turecku”. Kawa filtrowana nie wywołuje tego zjawiska (Nawrot i in. 2003). Udowodniono, że spożycie kawy gotowanej w ilości 6 filiżanek dziennie skutkuje wzrostem lipoprotein o niskiej gęstości o 17,8 mg/L. Kawa przyczynia się do rozwoju choroby niedokrwiennej serca, w związku ze wzrostem poziomu cholesterolu jak również niekorzystnym działaniu na śródbłonek naczyń krwionośnych (Dam 2008).

7. Wpływ kofeiny na układ kostny

Codziennie spożycie wysokich dawek kofeiny może wywoływać objawy osteoporozy, przyczyniać się do powstawania złamań oraz mieć udział w procesie gojenia kości. Podczas

intensywnego wzrostu, kofeina negatywnie wpływa na strukturę kostną. Zwiększa się ryzyko złamań które jest związane ze wzrostem dawki teiny (Duarte i in. 2009).

U osób, które dostarczają niewielkie ilości wapnia z pożywieniem, kofeina wywołuje eliminację wapnia i magnezu z organizmu. Wzrost wydalania wapnia z moczem następuje już po 2 godzinach od przyjęcia 150-300 mg kofeiny. Suplementacja wapnia na poziomie 800 mg dziennie, pomimo przyjmowania kofeiny (około 400mg) nie powoduje zmian w strukturze kości, ani nie powoduje obniżenia poziomu wapnia we krwi. Określa się, że kofeina wywołuje apoptozę osteoblastów. Podawanie kofeiny w okresie noworodkowym skutkuje opóźnioną przebudową nasad kości piszczelowych oraz obrzękiem mitochondriów w osteoblastach. Wzmacnia ekspresję receptorów dla glukokortykoidów w osteoblastach, które są uważane za główny czynnik biorący udział w rozwoju osteoporozy (Duarte i in. 2009).

8. Wpływ kofeiny na układ nerwowy

Kofeina jest uznawana za jeden z najpopularniejszych środków psychoaktywnych pobudzających ośrodkowy układ nerwowy. U pacjentów spożywających umiarkowane ilości kofeiny można zauważyć wzrost czujności i koncentracji, poprawę nastroju oraz polepszenie funkcji poznawczych i motorycznych.

Korzyści wynikające ze spożywania kofeiny w dużym stopniu zależą od przyjętej dawki. Po przyjęciu około 32 mg kofeiny zauważono polepszenie czujności oraz wzrost reakcji organizmu na bodźce wzrokowe i słuchowe. Dawka 200-250 mg wywołuje blokadę receptorów adenozytowych, co wpływa na poprawę nastroju, koncentracji i koordynacji ruchowej. Odnotowano, że u osób zmęczonych, wykonywanie funkcji motorycznych oraz intelektualnych przebiega lepiej po przyjęciu kofeiny. U osób wypoczętych nie zauważa się takiej zależności (Wielosz i Kleinrok 1996).

Wysokie dawki kofeiny rzędu od 300 do 600 mg działają pobudzająco na cały ośrodkowy układ nerwowy, łącznie z rdzeniem kręgowym, co wywołuje nadmierne pobudzenie, bezsenność, niepokój oraz wzrost napięcia. W przypadku pacjentów z zaburzeniami lękowymi, dochodzi do nasilenia tych objawów. Wysokie dawki teiny powodują stymulację ośrodka termoregulacji, oddechowego i naczynioruchowego (Wielosz i Kleinrok 1996; Dworzański i in. 2009).

Częstotliwość spożywania kofeiny ma również wpływ na wrażliwość organizmu na teinę. Podanie zwiększonej dawki kofeiny u osób, które zwykle przyjmują jej mniejsze ilości wywołuje wzrost ciśnienia krwi i pobudzenie. W przypadku osób zwykle przyjmujących wysokie dawki substancji, obserwuje się wzmożoną reakcję na bodźce zewnętrzne. U osób starszych, kofeina może wywoływać objawy senności, co jest efektem zwiększonego obrotu katecholamin w ośrodkowym układzie nerwowym (Attwood i in. 2007).

9. Wpływ kofeiny na układ pokarmowy

W przewodzie pokarmowym, kofeina wywołuje nasilenie wydzielania soku żołądkowego oraz działa rozkurczowo na mięśnie gładkie. Można więc przypuszczać, że przyczynia się do rozwoju zmian zapalnych w obrębie błony śluzowej żołądka i jelit. Kofeina zwiększa syntezę gastryny, która wywołuje rozkurcz mięśni zwieracza przełyku (Lohsiriwat i in. 2006).

Stałe przyjmowanie umiarkowanych dawek kofeiny wpływa negatywnie na tolerancję glukozy co powoduje wzrost jej stężenia we krwi. Zwiększa stężenie insuliny przy jednoczesnym spadku wrażliwości tkanek na działanie tego hormonu. W przypadku pacjentów przyjmujących dwa razy dziennie kofeinę w ilości 200 mg przez tydzień, zauważono spadek wrażliwości na insulinę o 35%. Uważa się, że jest to związane ze zwiększeniem stężenia adrenaliny we krwi. Spożywanie około 6 filiżanek kawy dziennie hamuje rozwój cukrzycy typu 2, a ryzyko zapadalności na tę chorobę spada o 22%. To zjawisko jest związane z uwalnianiem kwasów tłuszczowych i glikogenu oraz ich oksydacją. Powoduje to wzrost wydatkowania energii (Dam 2008). Istnieją dane literaturowe wskazujące, że spożycie kofeiny hamuje rozwój raka jelita grubego, jednak mechanizm tej protekcji wymaga kolejnych badań (Temple 2009).

10. Wpływ kofeiny na ciążę i laktację

Kofeina przenika przez barierę łożyskową, a u płodu osiąga podobne stężenia jak w organizmie matki. U noworodków często obserwuje się hiperkofeinemię. Czas połowicznego rozpadu kofeiny w okresie ciąży jest trzykrotnie dłuższy. Kofeina ulega przemianie do teofiliny, która ponownie w procesie metylacji ulega przekształceniu do kofeiny (Wierzejska i Jarosz 2003).

Badania na modelach zwierzęcych pokazują, że wysokie dawki kofeiny mogą wykazywać działanie teratogenne. Doświadczenia przeprowadzane na małpach ujawniły, że codzienne stosowanie kofeiny w dawce 10-30 mg/kg powoduje zmniejszenie masy urodzeniowej płodów. Znotowano wzrost liczby poronień. Badania z użyciem myszy ujawniły, że kofeina wywołuje pojawienie się obrzęków i wylewów u płodów (Burdan 2000).

Wykazano, że u dzieci matek spożywających około 28 filiżanek kawy tygodniowo, wzrasta ryzyko pojawienia się wad rozwojowych. Obserwowano rozszczep warg, wady kończyn, spodziectwo i wady przegrody międzykomorowej. Częstotliwość pojawienia się tych schorzeń jest dwukrotnie wyższa w porównaniu z grupą kontrolną (Subramanian 2008). Kofeina może także utrudniać zajście w ciążę ze względu na jej działanie embriotoksyczne, a spożycie kofeiny w codziennej dawce powyżej 300 mg zwiększa ryzyko poronienia. Warto zauważyć, że nadmierne spożycie kawy (ponad 600 mg/dzień) wpływa na niską masę urodzeniową dziecka. Wzrasta ryzyko utraty płodu oraz istnieje możliwość rozwoju dysfunkcji układu oddechowego i krążenia (Burdan 2000). Kofeina występuje w mleku matki karmiącej. Przyjmowanie kofeiny w dawce 30-300 mg przez matkę powoduje, że do organizmu dziecka dostaje się około 1-3 mg substancji. Ma to negatywny wpływ na młody organizm, wywołując problemy ze snem i rozdrażnienie (Subramanian 2008).

11. Podsumowanie

Kofeina jest często spożywana przez ludzi w celu poprawy wydajności uczenia się i pamięci. Zaliczana jest do najpopularniejszych środków o działaniu psychoaktywnym. Kofeina jest dobrze przyswajana w układzie pokarmowym i szybko dystrybuowana do pozostałych tkanek, a także łatwo przekracza barierę krew-mózg zarówno poprzez dyfuzję prostą, jak i na drodze aktywnego transportu. Kofeina wykazuje szerokie działanie lecznicze. Znalazła zastosowanie w preparatach przeciwmigrenowych, przeciwastmatycznych, przeciwbólowych i pobudzających (Frankowski i in. 2008). Należy jednak pamiętać o negatywnych skutkach jej zażywania i jej ujemnym wpływie na fizjologię układu krążenia, układu pokarmowego, nerwowego i kostnego. Szczególnie kobiety w ciąży, matki karmiące, dzieci i osoby starsze powinny uważać na ilość spożywanej kofeiny, która u tych grup ludzi może wywoływać negatywne działanie.

12. Bibliografia

- Andrews KW, Schweitzer A, Zhao C, Holden JM, Roseland JM, Brandt M, Dwyer JT, Picciano MF, Saldanha LG, Fisher KD, Yetley E, Betz JM, Douglass L (2007) The caffeine contents of dietary supplements commonly purchased in the US: analysis of 53 products with caffeine-containing ingredients. *Anal Bioanal Chem.* Sep;389(1):231-9.
- Attwood AS, Higgs S, Terry P (2007) Differential responsiveness to caffeine and perceived effects of caffeine in moderate and high regular caffeine consumers. *Psychopharmacol* 2007, 190: 469-477.
- Burdan F (2000) Teratogenne i embriotoksyczne działanie kofeiny: fakty i hipotezy. *Pol Merkuriusz Lek*, 9 (52): 726-728.
- Dam RM (2008) Coffee consumption and risk of type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and cancer. *Appl Physiol Nutr Metab*, 33: 1269-1283.
- Duarte PM, Marques MR, Bezerra JP (2009) The effects of caffeine administration on the early stage of bone healing and bone density. A histometric study in rats. *Arch Oral Biol*, 54: 717-722.
- Dworzański W, Opielak G, Burdan F (2009) Niepożądane działania kofeiny. *Pol Merk Lek*, 27: 357-361.

- Fiebich BL, Lieb K, Hüll M, Aicher B, van Ryn J, Pairet M, Engelhardt G (2000) Effects of caffeine and paracetamol alone or in combination with acetylsalicylic acid on prostaglandin E2 synthesis in rat microglial cells. *Neuropharmacology*, 39: 2205-2213.
- Frankowski M, Kowalski A, Ociepa A (2008) Kofeina w kawach i ekstraktach kofeinowych i odkofeinowanych dostępnych na polskim rynku. *Bromatologia i Chemia Toksykologiczna*; 1: 21-27.
- Grosso LM, Bracken MB (2005) Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: a review of exposure assessment considerations during pregnancy. *Ann Epidemiol*, 15(6): 460-466.
- Janus K (1993) Kofeina jako substancja modelowa służąca do oceny metabolicznej wydolności wątroby. *Probl Ter Monitor*, 4(1): 27-29
- Lohsiriwat S, Puengna N, Leelakusolvong S (2006) Effect of caffeine on lower esophageal sphincter pressure in Thai healthy volunteers. *Dis Esophagus*, 19: 183-188.
- Nawrot P, Jordan S, Eastwood J, Rotstein J, Hugenholtz A, Feeley M (2003) Effects of caffeine on human health. *Food Addit Contam*, 20(1): 1-30.
- Nehlig A (1999) Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neurosci Biobehav Rev*, 23: 563-576
- Subramanian A (2008) CNS stimulants. [in:] *Drug facts and comparisons*. Wolters Kluwer Health, St Louis: 1077-1078.
- Tanda G, Goldberg SR (2000) Alteration of the Behavioral Effects of Nicotine by Chronic Caffeine Exposure. *Pharmacol Biochem Behav*, 66(1): 47-64.
- Temple JL (2009) Caffeine use in children: What we know, what we have left to learn, and why we should worry. *Neurosci and Biobehav Rev*, 33: 793-806.
- Wielosz M, Kleinrok Z (1996) Leki cucące i psychostymulujące. [w:] Danysz A, Kleinrok Z. *Podstawy farmakologii*. Volumed, Wrocław: 273-274.
- Wielosz M, Kleinrok Z (1996) Leki cucące i psychostymulujące. [w:] *Podstawy farmakologii*. Danysz A, Kleinrok Z. Volumed, Wrocław: 273-274.
- Wierzejska R, Jarosz M (2003) Caffeine and health. *Zywnienie Czlow Metabol*, 30(3/4): 1234-1241
- Zhang W (2001) A benefit-risk assessment of caffeine as an analgesic adjuvant. *Drug Saf*, 24 (15): 1127-1142.

7. CRISPR/Cas9: narzędzie do edycji genomu

CRISPR/Cas9: tool for genome editions

Agata Macionga, Kamila Stopińska, Wioletta Szywacz, Sylwia Mielcarska, Małgorzata Poręba

Katedra Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii przy Szpitalu Klinicznym nr 1 w Zabrze,
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Opiekunowie naukowci: mgr Nikola Szweda, prof. dr hab. n. med.. Władysław Grzeszczak

Kamila Stopińska: kamila_stopinska@o2.pl

Słowa kluczowe: edycja genomu, endonukleaza, mutacja

Streszczenie

System CRISPR/Cas9 jest narzędziem służącym do edycji genomu, które znajduje szereg zastosowań w medycynie. Poprzez wybiórcze przecinanie nici DNA, prowadzi do insercji, delekcji lub substytucji w zakładanych wcześniej miejscach. Umożliwia usuwanie, indukowanie lub wygaszanie mutacji stając się dzięki temu doskonałym aparatem do modyfikacji materiału genetycznego. CRISPR/Cas9 jest wykorzystywany w badaniach nad nowymi strategiami diagnostycznymi i terapeutycznymi w zakresie chorób nowotworowych, zakaźnych, dziedziczonych genetycznie, dla których nie opracowano dotychczas metod leczenia przyczynowego.

1. Wstęp

Edycja genomu jest narzędziem mogącym znaleźć zastosowanie w diagnostyce i terapii wielu chorób. Wykorzystanie potencjału tej metody może pozwolić na stworzenie nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych oraz zastąpić konwencjonalne, dotychczas stosowane metody leczenia. W niektórych przypadkach może pozwolić na całkowite wyeliminowanie czynnika wywołującego dane schorzenie. W niniejszej pracy postaramy się przybliżyć szczególnie obiecujący rodzaj edycji genomu, a mianowicie system CRISPR/Cas9.

2. Opis zagadnienia

Zgrupowane, regularnie powtarzające się sekwencje palindromiczne CRISPR (*Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats*)/Cas9 mogą służyć jako narzędzie do edycji genomu. Umożliwiają precyzyjne manipulowanie określonymi elementami genomowymi oraz pomagają wyjaśnić funkcję genów w biologii organizmów i procesach patologicznych. Kompleks CRISPR-Cas9 składa się z niespecyficznego endonukleazy Cas9 i RNA CRISPR (crRNA) umożliwiającego wybiórcze przecięcie nici DNA przez Cas9 w docelowym miejscu. Następujący później proces naprawy komórkowego DNA prowadzi do pożądanego insercji, delekcji lub substytucji w zakładanych wcześniej miejscach docelowych. Specyficzność rozszczepiania DNA, w którym uczestniczy CRISPR/Cas9 wymaga sekwencji docelowych pasujących do crRNA sąsiadującego PAM (protospacera) zlokalizowanego poniżej sekwencji docelowych (Feng Zang i in. 2014). Kompleks ten został wykryty w bakteriach i archeonach (jednokomórkowce zaliczane do prokariotów), jako nabyty układ odpornościowy przeciw wirusom i bakteriofagom. W systemie CRISPR-Cas9 inwazja obcego DNA jest przetwarzana przez nukleazę Cas-9 na małe fragmenty DNA, które następnie są włączane do *locus* CRISPR genomów gospodarza jako przerywniki. W odpowiedzi na infekcje wirusowe i fagowe, przerywniki są stosowane jako matryce transkrypcyjne do wytwarzania crRNA, który umożliwia endonukleazie cięcie docelowych sekwencji DNA atakujących wirusów i fagów (Knott i in. 2018). Wyżej opisane narzędzie do edycji genomu zostało po raz pierwszy zastosowane w 2013 roku (Ishino i in. 2018). Metoda ta jest bardzo obiecująca w porównaniu z konwencjonalnymi, ponieważ jest prosta w obsłudze i projektowaniu, a także umożliwia multikompleksowanie (możliwość edycji wielu genów jednocześnie). Może być narzędziem terapeutycznym poprzez korygowanie mutacji będących przyczynami zaburzeń

monogenicznych. Znajduje zastosowanie podczas modyfikacji genomu patogenów (m.in. HIV-1) oraz może indukować ochronne lub terapeutyczne mutacje w tkankach gospodarza. CRISPR/Cas9 wykazał w badaniach potencjał w terapii genowej raka, poprzez dezaktywację wirusa onkogenego i indukowanie ekspresji onkosupresorów (Xiao-Jie i in. 2015). Wprowadzenie mutacji w genotypie organizmów wektorowych (komary *Anopheles*) może skutkować zmniejszeniem ich populacji, a w konsekwencji zachorowalności i śmiertelności na choroby przez nie przenoszone.

3. Przegląd literatury

3.1 Nowotwory

Rozwój nowotworu jest wieloetapowym procesem, który jest wyzwalany przez wrodzone i nabyte mutacje powodujące nieprawidłowości funkcjonalne, skutkujące indukacją i progresją choroby. System CRISPR/Cas9 wprowadzając modyfikacje genetyczne w liniach komórkowych, narządach i zwierzętach umożliwia rozszerzenie edycji genów na badania przesiewowe całego genomu. Znajduje zastosowanie w tworzeniu modeli raka u zwierząt *in vivo* umożliwiając dokładne analizy i badania (np. obserwowanie dynamicznych procesów takich jak regulacji aktywacji transkrypcji lub represji) (Chen i in. 2016). Nowotwory jelita grubego u ludzi są związane z nawracającymi mutacjami w genach kodujących białka działających na szlakach WNT, MAPK, TGF- β , TP53 i PI3K. Badacze z Uniwersytetu Keio w Japonii użyli systemu CRISPR-Cas9 do wprowadzenia mutacji do organoidów pochodzących z prawidłowego nabłonka jelita grubego człowieka. Poprzez modulowanie warunków hodowli w celu naśladowania warunków niszy jelitowej wybrano izogeniczne organoidy niosące mutacje w genach supresorowych nowotworów: APC, SMAD4 i TP53 oraz w onkogenach: KRAS i PIK3CA. Organoidy zaprojektowane do ekspresji wszystkich pięciu mutacji rosły niezależnie od czynników niszowych *in vitro* i tworzyły guzy po wszczępieniu do nerki myszy. Po wstrzyknięciu do śledziony myszy wytworzyły mikroprzerzuty zawierające komórki inicjujące powstawanie nowotworu, jednak nie udało im się skolonizować w wątrobie. Natomiast zmodyfikowane organoidy pochodzące z ludzkich gruczolaków tworzyły kolonie przerzutowe. Wyniki te sugerują, że mutacje szlaku „*driver*” umożliwiają utrzymanie komórek macierzystych w wrogim mikrośrodkowisku guza, a do przejścia w postać inwazyjną potrzebują dodatkowych zmian molekularnych (Matano i in. 2015). W 90% przypadków gruczolakoraka przewodowego trzustki występuje zmiana w obrębie protoonkogenu Kras, która prowadzi do niekontrolowanej proliferacji komórek nowotworowych. Naukowcy z Uniwersytetu w Erlagen w Niemczech odkryli system klastrów CRISPR/Cas9, który można wykorzystać do wyeliminowania mutacji Kras. Podczas badań zastosowano trzy linie komórkowe z heterozygotyczną mutacją Kras (ludzkie linie komórkowe SUIT-2 i Panc-1 oraz linia komórkowa TB32047 z mysiego modelu KPC). Po transfekcji i klonowaniu jednokomórkowym wyizolowano białka z dwóch kontroli ujemnych i od pięciu klonów w celu weryfikacji „knock-out” i analizy kluczowych zmian w białkach transdukcji sygnału. Western Blot wykazał specyficzny „knock-out” w białku KrasG12D, ale Kras typu dzikiego był obecny we wszystkich komórkach. Analiza transdukcji sygnału dla Erk, Akt, Atax3, AMPK α i c-myc ujawniła poziomy ekspresji zbliżone do typu dzikiego. Wyniki te dowiodły, że jest możliwe wyeliminowanie mutacji KrasG12D przez CRISPR/Cas9 (Lentsch i in. 2019).

3.2 Choroby zakaźne

Edycja genomu przez system CRISPR/Cas9 pierwotnie została odkryta jako adaptacyjny prokariotyczny układ odpornościowy, który został ponownie wykorzystany do badań genetycznych. Pierwotniaki to pasożyty jednokomórkowe wywołujące choroby u milionów ludzi na świecie. W przypadku chorób takich jak malaria, choroba Chagasa, leiszmanioza, kryptosporidioza nie odkryto dotąd skutecznych metod zapobiegania zakażeniu lub szczepionek. Malaria jest chorobą powodującą bardzo wysoką zachorowalność i śmiertelność wśród ludzi mieszkającym na obszarze tropikalnym i subtropikalnym. Jest wywoływana przez drobnoustroje z rodzaju *Plasmodium* przenoszone przez komary. Przeprowadzono badania mające na celu sprawdzenie, czy edycja genomu może przyczynić się do zmniejszenia zachorowalności na malarię, której głównym wektorem jest *Anopheles gambiae*. Zmodyfikowano trzy geny u *A.gambiae* (AGAP005958, AGAP011377 i AGAP007280), które nadają recesywny fenotyp bezpłodności po rozbićiu i wstawiono do każdego

locus CRISPR/Cas9 zaprojektowanego do edycji każdego z genów. Dla każdego docelowego *locus* zaobserwowano silny „napęd genowy” na poziomie molekularnym z szybkością transmisji do potomstwa od 91.4% do 99.6%. Modelowanie populacji i eksperymenty wykazały, że kompleks CRISPR-Cas9 ukierunkowany na *loci* AGAP007280 spełnia wymagania dla „napędu genowego” ukierunkowanego na reprodukcję samic w populacji owadów. Metodę tą można wykorzystać do tłumienia populacji owadów poprzez doprowadzenie samic do bezpłodności, co bezpośrednio przełoży się na zmniejszenie liczny wektorów odpowiedzialnych za rozprzestrzenianie się malarii (Lander i in. 2016). W przebiegu malarii pasożyty *Plasmodium* oddziałują z powierzchnią krwinek czerwonych umożliwiając inwazję, a następnie namnażanie wewnątrz komórki. Wytworzono system hodowli *in vitro* do wytwarzania czerwonych krwinek (*red blood cell* -RBC), który pozwala na generowanie nokautów genowych przez CRISPR/Cas9 przy użyciu nieśmiertelnej linii erytroleukemii (JK-1). Komórki JK-1 różniąc się, generują komórki na różnych etapach erytropoezy, w tym końcowo zróżnicowane jądrzaste czerwone krwinki (*terminally differentiated nucleated RBC* - *jkRBC*). Badanie drobnocząsteczkowych regulatorów epigenetycznych zidentyfikowało kilka inhibitorów dla specyficznych domen, które promują różnicowanie i umożliwiają wytwarzanie populacji jkRBC. Proteomiczne profilowanie powierzchni wykazało, że jkRBC posiadają ekspresję wszystkich znanych receptorów występujących u gospodarza *Plasmodium* podobną do tej występujących na pierwotnych krwiotwórczych komórkach macierzystych CD34+ (cRBC). Zauważono, że wiele szczepów *Plasmodium* atakuje jkRBC na porównywalnym poziomie, co cRBC i RBC. Za pomocą CRISPR/Cas9 usunięto „basigin” (BSG) i CD44. „Knockout” BSG był całkowicie odporny na inwazję pasożytów, potwierdzając istotną rolę BSG podczas inwazji. CD44 zostało zidentyfikowane na przeglądzie RNAi genów grup krwi jako czynnik sprzyjający inwazji, w związku z czym jego „knockout” może spowodować znaczące zmniejszenie inwazji pasożyta (Kanjee i in. 2017). Edycja genomu CRISPR/Cas9 jest skuteczna jako narzędzie do badania genów bakteryjnych oraz żywych atenuowanych szczepionek. Opisano metodę edycji genomowego DNA *Bacillus anthracis* i *Bacillus cereus* przy użyciu CRISPR/Cas9. Wykorzystano w niej dwa profagi *B. anthracis* jako cele i uzyskano mutanty z dużym fragmentem z częstością 100 lub 20%. W przypadku *B. cereus* wprowadzono precyzyjne mutacje punktowe do pIcR przy pomocy testów fenotypowych, które wykazały, że uzyskane mutanty straciły aktywność hemolitycznych i fosfolipazowych podobnych do *B. anthracis*, który jest naturalnym mutantem pIcR. Udowodniono, że CRISPR/Cas9 może skutecznie modyfikować geny docelowe bez pozostawiania obcego DNA, takiego jak markery selekcyjne antybiotyków, w związku z czym może służyć, jako narzędzie genetyczne edycji genomu w grupie *Bacillus*. System ten może być stosowany do wytwarzania żywych szczepionek przeciw węglikowi (Wang i in. 2019).

Możliwości edycji genomu przez CRISPR/Cas9 zainteresowały naukowców zajmujących się badaniami nad HIV-1. Badacze z Uniwersytetu w Wuhan w Chinach wykorzystali CRISPR/Cas9 do zakłócania koreceptorów HIV-1 CCR5 lub CXCR4, co doprowadziło do zmniejszenia wirerii. Zaprojektowano dwie kombinacje gRNA ukierunkowane na CXCR4 i CCR5. Po zastosowaniu testów prowokacji HIV-1 stwierdzono, że w zmodyfikowanych komórkach odsetek infekcji był znacząco niższy. Ponadto testy apoptozy wykazały, że jednoczesne rozerwanie CXCR4 i CCR5 przez CRISPR/Cas9 nie miało cytotoksycznego wpływu na żywotność komórek (Liu i in. 2019). Przeszczep krwiotwórczych komórek macierzystych (HSC) z naturalnie występującą mutacją CCR5 powodował u pacjentów wcześniej zarażonych HIV-1 poddanych temu zabiegowi brak wykrywalności wirusa we krwi. Leczenie antyretrowirusowe (cART) jest skuteczne w zmniejszaniu miana wirusa, jednak nie powoduje jego eradykacji. Konwencjonalne leczenie powoduje szereg skutków ubocznych, a także zmusza do przyjmowania leków do końca życia. Ablacja CCR5 w HSC została przebadana pod kątem zastosowania jej jako leczenia HIV-1, dającego szansę na pełne wyleczenie. Stworzono system edycji genów CRISPR/Cas9 w ludzkich komórkach progenitorowych CD34+. Skuteczność zakłócania CCR5 została potwierdzona w powtórnie przeszczepionych komórkach. Edycja CCR5 może stanowić strategię terapeutyczną w kierunku leczenia zakażenia HIV-1 i umożliwić całkowitą eradykację wirusa z organizmu (Xu i in. 2017; Mefferd i in. 2018). Choroby zakaźne są jedną z głównych przyczyn śmiertelności na całym świecie. System CRISPR/Cas9 zrewolucjonizował badania biomedyczne i dał nadzieję na opracowanie metod leczenia zakażeń wywołanych przez

wielolekooporne organizmy (np. *Mycobacterium tuberculosis*) oraz ograniczenie śmiertelności związanej z przewlekłymi zakażeniami (WZW B, HIV-1) (Doerflinger i in. 2017).

3.3 Choroby genetyczne

Technologia CRISPR/Cas9 dzięki swoim właściwościom umożliwiającym wybiórczą edycję genomu, może być stosowana do tworzenia nowych strategii terapeutycznych dla schorzeń wywoływanych przez mutacje genetyczne takich jak: Dystrofia mięśniowa Duchenne’a, hemofilia, mukowiscydoza, zespół łamliwego chromosomu X (Cai i in. 2016). Dystrofia mięśniowa Duchenne’a (DMD) jest nerwowo-mięśniową chorobą genetyczną sprzężoną z chromosomem X, spowodowaną brakiem dystrofiny z powodu mutacji w genie DMD. Ponieważ dystrofina jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania serkołemy, brak tego białka prowadzi do uszkodzenia mięśni i ujawnienia się DMD. Obecnie nie ma terapii skierowanej na przyczynę tego schorzenia, stosuje się jedynie leczenie objawowe. Ponieważ DMD jest schorzeniem monogenicznym, do jej leczenia może być zastosowana terapeutyczna edycja genomu. Technologia CRISPR/Cas9 może być wykorzystana do doprowadzenia terapii genowej pacjentów z DMD. W sposób niezależny od posiadanej przez pacjenta mutacji można modulować czynniki modyfikujące przebieg choroby. Zależnie od rodzaju mutacji, w przypadku duplikacji dystrofiny odpowiedniej długości można przywrócić za pomocą sgRNA. Delecje w genie DMD i mutacje punktowe można przywrócić poprzez usunięcie lub modyfikację eksonów w celu wytworzenia krótszej dystrofiny. Składniki dla wyżej wymienionych strategii dostarczono *in vivo* przy pomocy wektora AAV (*adeno-associated virus*, wirus związany z adenowirusem) do modelu mysiego. Uzyskano normalizację wytwarzania dystrofiny (Wong i in. 2017). Ten sam wektor został wykorzystany przy edycji genomu podczas opracowywania strategii terapeutycznej hemofilii B, która jest chorobą krwotoczną spowodowaną mutacjami w genie czynnika krzepnięcia IX (F9). Za pomocą CRISPR/SaCas9 i AAV uzyskano modyfikację F9 w hepatocytach, która doprowadziła do przywrócenia prawidłowej hemostazy u badanych myszy (Ohmori i in. 2017). Zespół łamliwego chromosomu X (*Fragile X-chromosome syndrome* FXS) jest częstą przyczyną niepełnosprawności intelektualnej, która jest spowodowana mutacją powtórzeń CGG w genie FMR1, która wyzwała epigenetyczne wyciszenie genu. Dostępne leki mogą jedynie przejściowo indukować reaktywację FMR1 w obecności wydłużonego powtórzenia CGG. Naukowcy z Emory University w Atlancie wycięli poszerzone powtórzenie CGG z hybrid komórek somatycznych zawierających mutację FXS przy pomocy CRISPR/Cas9. Zaobserwowano reaktywację transkrypcji w około 67% kolonii hybridowych poddanych obróbce przez CRISPR/Cas9 i wykazano spadek metylacji DNA w *locus* FMR1. Wycięcie rozszerzonego powtórzenia CGG z łamliwego chromosomu może spowodować reaktywację FMR1, co zapobiegnie wyciszeniu genu i następującej mutacji (Xie i in. 2016).

4. Podsumowanie i Wnioski

Edycja genomu za pomocą systemu CRISPR/Cas9 może służyć jako narzędzie umożliwiające wdrożenie nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych w medycynie. CRISPR/Cas9 może być wykorzystywany do eliminacji onkogenów, zapobiegając w ten sposób późniejszej inicjacji i progresji nowotworu. Pozwala na wytworzenie modeli nowotworowych *in vivo* u zwierząt, umożliwiając dokonanie analiz na temat przebiegu procesu nowotworzenia. System ten ma szerokie zastosowanie w dziedzinie walki z chorobami zakaźnymi. Edycja genomu może być narzędziem umożliwiającym wytworzenie odporności genetycznej na różne patogeny. Pokłada się także nadzieje w wykorzystaniu CRISPR/Cas9 w ograniczeniu populacji organizmów będących wektorami dla groźnych dla zdrowia ludzi drobnoustrojów. Wprowadzanie punktowych mutacji do materiału genetycznego patogenów może pomóc w wytworzeniu skutecznych szczepionek przeciwko tym patogenom. Wybiórcza edycja genomu ma szansę otworzyć nowy rozdział w leczeniu schorzeń genetycznych w sposób przyczynowy. Jednak istnieje konieczność przeprowadzenia szeregu badań, aby mogła być wprowadzona do praktyki klinicznej. Należy sprawdzić ich skuteczność, oraz czy wprowadzanie mutacji w zaplanowanym punkcie, nie wpływa na powstawanie innych, niepożądanych zmian. Dyskusja toczy się także wokół wywoływania odpowiedzi ze strony układu immunologicznego organizmu, w którym dokonywana jest edycja genomu. Manipulowanie ludzkim

genomem i tworzenie zarodków poddanych modyfikacjom budzi wiele kontrowersji natury etycznej. Niemniej jednak system CRISPR/Cas9 jest obiecującym narzędziem, w którym wielu naukowców pokłada nadzieje na rozwój niedostępnych dotąd metod terapeutycznych.

5. Literatura

- Cai L, Fisher AL, Huang H i in. (2016) CRISPR-mediated genome editing and human diseases. *Genes & Diseases* 3(4):244-251
- Chen S, Sun H, Miao K i in. (2016) CRISPR-Cas9: from Genome Editing to Cancer Research. *International Journal of Biological Sciences* 12(12): 1427-1436
- Doerflinger M, Forsyth W, Ebert G i in. (2017) CRISPR/Cas9-The ultimate weapon to battle infectious diseases? *Cellular Microbiology* 19(2)
- Ishino Y, Krupovic M, Forterre P (2018) History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *J Bacteriol.*
- Kanjee U, Grüning C, Chaand M i in. (2017) CRISPR/Cas9 knockouts reveal genetic interaction between strain-transcendent erythrocyte determinants of *Plasmodium falciparum* invasion. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 114(44):E9356-E9365
- Knott GJ, Doudna JA (2018) CRISPR/Cas9 guides the future of genetic engineering. *Science* (6505) 866-869
- Lander N, Chiurillo MA, Docampo R (2016) Genome Editing by CRISPR/Cas9: A Game Change in the Genetic Manipulation of Protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 63(5):679-90
- Lentsch E, Li L, Pfeffer S i in. (2019) CRISPR/Cas9-Mediated Knock-Out of Kras^{G12D} Mutated Pancreatic Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences* 14;20(22)
- Liu Z, Chen S, Jin X i in. (2017) Genome editing of the HIV co-receptors CCR5 and CXCR4 by CRISPR-Cas9 protects CD4⁺ T cells from HIV-1 infection. *Cell & Bioscience* 7: 47
- Matano M, Date S, Shimokawa M i in. (2015) Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature Medicine* 21(3): 256-62
- Mefferd AL., Bogerd HP, Irwan Id i in. (2018) Insights into the mechanisms underlying the inactivation of HIV-1 proviruses by CRISPR/Cas. *Virology* 520:116-126
- Ohmori T, Nagao Y, Mizukami H i in. (2017) CRISPR/Cas9-mediated genome editing via postnatal administration of AAV vector cures haemophilia B mice. *Scientific Reports* 7(1):4159
- Wang Y, Wang D, Wang X i in. (2019) Highly Efficient Genome Engineering in *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* Using the CRISPR/Cas9 System. *Frontiers in Microbiology* 10: 1932
- Wong TWY, Cohn RD (2017) Therapeutic Applications of CRISPR/Cas for Duchenne Muscular Dystrophy. *Current Gene Therapy* 17(4):301-308
- Xiao-Jie L, Hui-Ying X, Zun-Pung K i in. (2015) CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *Journal of medical genetics* 52(5):289-96
- Xie N, Gong H, Suhl JA i in. (2016) Reactivation of FMR1 by CRISPR/Cas9-Mediated Deletion of the Expanded CGG-Repeat of the Fragile X Chromosome. *PloS One* 11(10):e0165499
- Xu L, Yang H, Gao Y i in. (2017) CRISPR/Cas9-Mediated CCR5 Ablation in Human Hematopoietic Stem/Progenitor Cells Confers HIV-1 Resistance In Vivo. *Molecular Therapy* 25(8):1782-1789
- Zhang F, Wen Y, Guo X (2014) CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human molecular genetics* 23(R1): R40-6

8. Wszystko jest zapisane w genach - FKBP5 czyli gen stresu i przemęczenia

Everything is saved in genes- FKBP5 as gene of stress and fatigue

Agata Macionga, Wioletta Szywacz, Małgorzata Poręba, Sylwia Mielcarska, Kamila Stopińska

Katedra Chorób Wewnętrznych, Diabetologii i Nefrologii przy Szpitalu Klinicznym nr 1 w Zabrze, Wydział Nauk Medycznych w Zabrzu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Opiekunowie naukowci: mgr Nikola Szweda, prof. dr hab. n. med.. Władysław Grzeszczak

Agata Macionga: agamacionga@gmail.com

Słowa kluczowe: zespół stresu pourazowego, depresja, stres w dzieciństwie, genetyka

Streszczenie

Gen FKBP5 koduje białko, które moduluje aktywność receptora kortyzolu w mózgu. Dzięki temu uczestniczy w odpowiedzi na działanie stresu. Powstało wiele badań mających na celu sprawdzenie, na rozwój których patologii mogą wpływać polimorfizmy genu FKBP5 i za pomocą jakich mechanizmów oddziałują. Zbadano istnienie korelacji z rozwojem zespołu stresu pourazowego, stanów lękowych, depresji, czy zespołu chronicznego zmęczenia. Z badań wynika, że nokaut (usunięcie) genu FKBP5 u myszy narażonych na długotrwały stres powoduje, że w porównaniu z grupą kontrolną nie wykazują one zachorowania na depresję. Zwiększone ujemne sprzężenie zwrotne glukokortykoidów w obrębie osi podwzgórze-przysadka-nadnercza zostało wykazane u myszy z nokautem genu FKBP5. Stwierdzono brak korelacji między genotypem FKBP5 w polimorfizmie rs1360780 a występowaniem zespołu chronicznego stresu oraz poziomem klas immunoglobulin. Interakcja genu FKBP5 w rs3800373 z narażeniem na wydarzenie traumatyczne, wiąże się z bardziej nasilonymi objawami PTSD. Istnieje też korelację genu FKBP5 z genem CRHR1, które wspólnie wpływają na wzrost nasilenia objawów pacjentów z zespołem stresu pourazowego. Gen FKBP5 odpowiada również za wystąpienie przewlekłych dolegliwości bólowych po przebytej traumie. Udowodniono, że połączenie wariantu genu FKBP5 ze stresem związanym z przeciwnościami losu we wczesnym okresie dzieciństwa wpływa na lęk, jak również na rozwój mózgu.

1. Wstęp

Gen FKBP5 jest zlokalizowany w egzonie 13 na krótkim ramieniu chromosomu 13. Gen FKBP5 koduje izomerazę propylową 5, czyli białko wiążące FK506. Białko to należy do rodziny immunofilin, które zaangażowane są w immunoregulację i procesy komórkowe, takie jak fałdowanie białek. Jest to proteina, która moduluje receptor kortyzolu w mózgu. Główna ekspresja tego białka zachodzi w tkance tłuszczowej i węzłach limfatycznych.

Białko wiążące FK506 jest ważnym elementem odpowiedzi organizmu na stres. Dodatkowo pełni ono rolę białka opiekuńczego dla receptora glukokortykoidowego. Badania wskazują, że FKBP5 pełni hamującą rolę w sygnalizacji glukokortykotropowej na poziomie molekularnym i ogólnoustrojowym. FKBP5 wiąże się z białkiem szoku cieplnego 90, białkiem P23 oraz z innymi białkami pełniącymi funkcję opiekuńcze w receptorze steroidowym, wpływając w ten sposób na regulację reakcji na stres.

2. Opis zagadnienia

Wokół genu FKBP5 narodziło się wiele hipotez, które naukowcy w ciągu ostatnich lat postanowili zbadać. Nasza praca miała na celu zestawienie najnowszych doniesień związanych z genem FKBP5. Skoncentrowaliśmy się na najczęściej badanych zagadnieniach, poruszających rolę genu FKBP5 w reakcji organizmu na stres z uwzględnieniem zespołu stresu pourazowego oraz stresu związanego z przeciwnościami losu w okresie wczesnego dzieciństwa. Zagłębiliśmy się również w tematykę funkcji genu FKBP5 w depresji i jej patofizjologii, w lęku i przemęczeniu.

3. Przegląd literatury

Naukowcy z Uniwersytetu Chung-Ang w Seulu postanowili sprawdzić czy utrata genu FKBP5 ma wpływ na reakcję organizmu na stres. W tym celu przeprowadzili badanie na myszach, porównując osobniki homozygotyczne typu dzikiego do tych z nokautem genu FKBP5. Myszy zostały poddane ekspozycji na długotrwały stres ograniczający. W wyniku ekspozycji osobniki dzikie wykazały anhedonię, czyli główny objaw zaburzenia depresyjnego. Natomiast myszy z nokautem genu FKBP5 nie zaprezentowały żadnych zachowań świadczących o wystąpieniu u nich depresji. Dodatkowo przeprowadzono sekwencjonowanie RNA. Analiza ta pozwoliła zauważyć, że przewlekły stres powodował zmiany w procesach biologicznych związanych z odpowiedzią zapalną i adhezją komórek. Dzięki temu zidentyfikowano moduły korelujące ze stresem lub genotypem badanego genu. Analiza badaczy pokazała, że u podstaw zachowania odpornego na stres u myszy z nokautem genu FKBP5 może leżeć aberracja w regulacji odpowiedzi immunologicznej oraz rozwoju układu neuroendokrynnego. Badania te pozwoli na potwierdzenie hipotezy, że gen FKBP5 pełni istotną rolę w reakcji na stres oraz wskazały drogę do stworzenia strategii leczenia łagodzenia powodowanych stresem objawów depresyjnych. (Kwon i in. 2019).

Jednymi z największych stresorów, na jakie jesteśmy narażeni są oczekiwania społeczne i wynikający z nich lęk przed porażką w społeczeństwie. Kolejne doświadczenie przeprowadzone na myszach porównało zachowanie, zmiany ekspresji neuroendokrynnnej i mRNA pomiędzy dzikimi myszami a laboratoryjnymi pozbawionymi genu kodującego FKBP5 (nokaut genu). Myszy z brakującym genem posiadały niższą masę nadnerczy, jak również poziom kortykosteronu podstawowy i po przewlekłym stresie. Cechowały się także bardziej aktywnym zachowaniem, jako sposobem radzenia sobie ze stresem. Wyniki testów sugerują zwiększone ujemne sprzężenie zwrotne glukokortykoidów w obrębie osi podwzgórze-przysadka-nadnercza, u myszy z nokautem genu. (Hartmann i in. 2012).

Jeśli tak zaskakujące wyniki badań zaobserwowano u myszy, jaką rolę może pełnić stres psychospołeczny i zaburzenia hormonalne wśród ludzi?

W gronie pacjentów chorych na depresję obserwuje się zaburzenia regulacji hormonalnej w układzie sprzężeń pomiędzy podwzgórzem, przysadką i nadnerczami. FKBP5 może służyć, jako potencjalny mediator systemu reakcji na stres, z czego może wynikać jego rola w rozwoju chorób związanych ze stresem.

Badanie przeprowadzone na 368 zdrowych dorosłych, którzy zostali poddani procedurze wywoływania umiarkowanego stresu w warunkach laboratoryjnych (TSST, Trier Social Stress Test); test skutkował zmienionymi poziomami kortyzolu. Następnie skorelowano u pacjentów poziom kortyzolu z różnymi wariantami genomowymi.

W analizie, najbardziej znaczący związek występował między wyjściowym kortyzolem a homozygotycznymi lub heterozygotycznymi nosicielami allelu C w rs4713902. Ponadto została zauważona korelacja z płcią. Odpowiedź kortyzolu u mężczyzn w badaniu była większa niż u kobiet (Mahon i in. 2013).

Ponieważ został udowodniony wpływ genu FKBP5 na rozwój depresji, naukowcy postanowili sprawdzić czy gen ten może również wpływać na rozwój, bądź objawy przemęczenia.

Zespół chronicznego zmęczenia jest chorobą o podłożu neuroimmunologicznym, której etiologia jest słabo poznana. Długotrwałe wyczerpanie po mimo odpoczynku, występowanie zaburzeń poznawczych oraz nadwrażliwości na ból i bodźce czuciowe to uciążliwe symptomy dla chorych. W obrazie klinicznym obserwowany jest również niewielki spadek immunoglobulin IgG3 i IgG4.

W testach przeprowadzonych w Niemczech na grupie badanej składającej się z 74 chorych pacjentów i 76 osób zdrowych (grupa kontrolna) nie wykazano korelacji między genotypem FKBP5 rs1360780 a występowaniem zespołu chronicznego przemęczenia.

Co więcej, nie zauważono również bezpośredniego wpływu SNP w rs1360780 (polimorfizm pojedynczego nukleotydu) na poziom badanych klas immunoglobulin. (Löbel i in. 2015).

Powyżej został opisany wpływ wariantów genu FKBP5 na poziom kortyzolu we krwi, jako efekt działania przewlekłego stresu. W tej części artykułu opiszemy wpływ wspomnianego genu na ryzyko rozwoju zespołu stresu pourazowego po traumatycznym przeżyciu.

Zespół stresu pourazowego (PTSD) jest przewlekłym zaburzeniem, które wynika z doświadczonego wcześniej urazu. W celu zrozumienia związku między objawami związanymi ze strachem i stresem a osią podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) zbadano relację pomiędzy polimorfizmami pojedynczego nukleotydu (SNP) genów osi HPA a objawami PTSD. W tym celu przeprowadzono badania na 1132 osobach, które były ofiarami trzęsienia ziemi w Chinach. Oceniono objawy PTSD przy użyciu skali PCL-5 oraz nasilenie i klastry objawów siedmioczynnikową hybrydową skalą DSM-5 dla PTSD. Dodatkowo oceniono SNP trzech genów osi HPA, w tym genu FKBP5: rs3800373, rs1360780, rs9470080, rs9296158. Z przeprowadzonych badań wynika, że interakcja genu FKBP5 w rs3800373z reakcją środowiskową, jaką jest narażenie na uraz, wiąże się z nasileniem objawów PTSD. Dodatkowo stwierdzono korelację genu FKBP5 z genem CRHR1, które wspólnie wpływały na wzrost nasilenia objawów u pacjentów z badanym zaburzeniem. (Zhang i in. 2019).

Ze względu na szerokie zainteresowanie naukowców związkiem między genotypem FKBP5 a diagnozą i nasileniem objawów PTSD Jaksic i współpracownicy przeprowadzili badania na 719 osobach, spośród których znajdowały się ofiary wojen bałkańskich z lat 90 z objawami PTSD i ofiary wojny bez PTSD oraz zdrowi wolontariusze. Wśród uczestników badania przeprowadzoną ocenę zgodną ze skalą PTSD oraz oznaczono genotyp SNP FKBP5 w rs1360780. Odkryto nominalny związek między allelem C a diagnozą PTSD wśród ofiar wojen bałkańskich. (Jaksic i in. 2019).

W 2019 roku Kuan i współpracownicy postanowili sprawdzić patofizjologię PTSD. Dokonano badania ekspresji genów w komórkach odpornościowych u 39 uczestników tragedii World Trade Center: 20 z PTSD i 19 bez PTSD. Wyniki pokazują, że gen FKBP5 i białko przez niego kodowane, podobnie jak w poprzednich badaniach jest regulowany w górę i proces ten zachodzi we wszystkich badanych komórkach odpornościowych, co wskazuje, że wpływ PTSD na badany gen prawdopodobnie nie jest specyficzny w stosunku do komórki. (Kuan i in. 2019).

Kolejnym krokiem, było przeprowadzenie badania, które sprawdzało wykorzystanie białka FKBP51, jako potencjalnego punktu uchwytu w leczeniu zespołu stresu pourazowego (PTSD) oraz depresji i znalezienie możliwych ligandów.

Jak już było wspomniane, oś podwzgórze - przysadka mózgowa - nadnercza (HPA) jest centralnym regulatorem reakcji na stres w organizmie. Oś ta jest kontrolowana przez hormony między innymi - glukokortykoidy (CORT) wytwarzane przez korę nadnerczy. Receptory glukokortykoidowe (GR) są głównymi receptorami cytoplazmatycznymi dla CORT. Receptory te w dużej ilości występują w mózgu. Białko wiążące - FKBP51 jest centralnym regulatorem systemu odpowiedzi na stres. Jego działanie polega na hamowaniu aktywności receptora glukokortykoidowego, zmniejszając jego powinowactwo do glukokortykoidów.

Celem badania była identyfikacja ligandów, które miały zdolność blokowania supresji receptora glukokortykoidowego (GR) za pośrednictwem FKBP51. W badaniu *in vitro* mesylan benzotropiny zaburzył heterokompleks FKBP51 / GR / Hsp90. Działanie tego związku potwierdzono wykonując kolejne analizy na modelach hodowli komórkowej, pierwotnych neuronach i skrawkach mózgu *ex vivo*. (Sabbagh i in. 2018).

Poza udowodnionym wpływem na rozwój PTSD gen FKBP5 wywiera wpływ na przetwarzanie doznań bólowych a także oddziałuje na ryzyko wystąpienia przewlekłych dolegliwości bólowych.

Istotne badanie przeprowadzone w Stanach Zjednoczonych na 1607 osobach pochodzących z różnych etnicznie grup wykazało zależność między wariantem genu FKBP5 w rs3800373 a chronicznym bólem mięśniowo-szkieletowym. Molekularny proces tłumaczący ten proces sugeruje, że allel korelowany z ryzykiem powoduje zmianę drugorzędowej struktury RNA, co skutkuje zmniejszeniem wiązania mikro RNA (miR-320a) do FKBP5. Docelowo występuje zmniejszona wrażliwość na receptor glukokortykoidowy. (Linnstaedt i in. 2018).

Pośród pacjentów, którzy uczestniczyli w wypadkach drogowych oraz wśród ofiar napaści seksualnej przeprowadzono badanie mające powiązać wystąpienie chronicznego bólu po upływie

sześciu tygodni od traumatycznego przeżycia z genetycznymi wariantami genu FKBP5. Pod uwagę wzięto sześć SNP (polimorfizmów pojedynczego nukleotydu). Poza opisanym powyżej rs3800373, na wystąpienie uogólnionego bólu całego ciała bądź bólu mięśni karku miały wpływ rs9380526, rs9394314, rs2817032 oraz rs2817040. Wśród tych genotypów najsilniejszą korelację wykazał rs2817032. (Bortsov i in. 2013).

Kolejnym aspektem jest wpływ stresu we wczesnym okresie życia. Przeciwności losu we wczesnym okresie życia, dzieciństwie i okresie dojrzewania wpływają negatywnie na zachowania w okresie dorosłości, zwiększając też ryzyko rozwoju zaburzeń psychicznych.

Przebadano 543 pacjentów, w grupie znajdowały się osoby, które doświadczyły stresu w pierwszych okresach życia. Wykazano wpływ genu FKBP5 (rs9196158) na zdolności kognitywne pod kątem pamięci roboczej. Do oceny pamięci zadaniowej używa się interferencję poznawczą. Do tego celu został wykorzystany test oparty na efekcie Stroopa. Im większa interferencja tym gorszy wynik sprawdzenia. Grupy homozygot AA i heterozygot AG z traumatycznymi przeżyciami w dzieciństwie wypadły znacząco słabiej. (Lovallo i in. 2019).

Kolejne badanie dotyczące interakcji stresu związanego z przeciwnościami losu we wczesnym okresie dzieciństwa i wysokiej ekspresji FKBP5, przeprowadzone przez Criado-Marrero i współpracowników, miały za zadanie sprawdzić czy w takiej korelacji są indukowane zmiany fenotypowe na poziomie zmian molekularnych w mózgu. W tym celu badacze poddali separacji matczynej nowonarodzone myszy z nadekspresją FKBP5 w przodomózgowiu. Po kolejnych dwóch miesiącach zaobserwowano, że u myszy z nadekspresją FKBP5 zwiększył się poziom lęku. W grzbietowej części hipokampu tych myszy zaobserwowano zredukowaną fosforylację kinazy białkowej B (AKT), co potwierdza zmiany molekularne zachodzące podczas stresu we wczesnym okresie dzieciństwa przy zmiennych poziomach FKBP5. W rezultacie przeprowadzonych badań udało się udowodnić, że kombinacja stresu związanego z przeciwnościami losu we wczesnym okresie dzieciństwa i FKBP5 wpływa na lęk i sygnalizację AKT w hipokampie. (Criado-Marrero i in. 2019).

Podobne do poprzednich badania nad przeciwnościami losu w okresie wczesnego dzieciństwa były przeprowadzone przez Matsudaira i współpracowników. Jako przeciwność losu potraktowali oni stopień akceptacji ze strony matek, a nie jak w innych badaniach maltretowanie w dzieciństwie. W celu przeprowadzenia badania wykonali oni genotypowanie polimorfizmu pojedynczego nukleotydu rs1360780 i obrazowanie rezonansem magnetycznym mózgu 202 japońskich dzieci, oraz kwestionariusz Family Diagnostic Test dla rodziców. Wyniki wykazały, że wśród nosicieli allelu T, powszechnie uważanego za ryzykowny allel dla zaburzeń związanych ze stresem, stwierdzono pozytywną korelację między akceptacją ze strony matki a objętością istoty szarej w lewym wzgórzu, przy porównaniu ich z homozygotami CC. Przy poziomie akceptacji matki równej i poniżej 70 percentyla, dzieci z allelem T miały, w porównaniu do homozygot CC, mniejszą regionalną objętość istoty szarej wzgórza. Świadczy to o zależnym od genotypu w rs1360780 wpływie poziomu akceptacji ze strony matki na rozwój mózgu. (Matsudaira i in. 2019).

Aby poszerzyć wiedzę na temat wpływu genu FKBP5 a przeciwnościami losu we wczesnym okresie dzieciństwa, przeprowadzono badanie na 85 osobach w ciężkiej depresji oraz 67 zdrowych osobach, jako próbie kontrolnej. Zbadano polimorfizm pojedynczego nukleotydu rs1360780 i objętość poszczególnych pól hipokampu w badanej grupie. Hipokampy pacjentów z ciężką depresją były mniejsze, natomiast pacjentów narażonych na przeciwności losu we wczesnym okresie dzieciństwa większe. Pośród tych pacjentów nosiciele allelu T, w porównaniu do nosicieli allelu C, prezentowali mniejszą objętość w obszarze między hipokampem a ciałem migdałowatym (HATA). Prezentowana zmiana objętości HATA związana z polimorfizmem genu FKBP5 jest dowodem na ważną rolę badanego genu w powstawaniu zmian strukturalnych w ciężkiej depresji. (Mikolas i in. 2019).

Przeprowadzone w Bostonie badanie mające sprawdzić czy zaburzenia afektywne (lęk lub depresja) ciężarnych może wpływać na epigenom płodu, w podobny sposób, w jaki wpływa narażenie na poważne stresory w dzieciństwie. Istotną rolę w rozwoju neurologicznym pełni genetyczna i epigenetyczna regulacja genów odpowiedzi na glikokortykoidy. Stresujące i niekorzystne warunki bytowo-środowiskowe wpływają na ten proces. Najpierw ustalono zależności między genotypem FKBP5 rs1360780 a wzorami metylacji krwi pępowinowej. Genotyp recesywny znacząco wpływał

na zwiększenie metylacji w podzbiorze przynajmniej 3 CpG zlokalizowanych w intronie 5. Intron 5 zawierający wysoce konserwatywny element odpowiedzi glukokortykoidowej genu FKBP5, prawdopodobnie odgrywa rolę rozwojową. Wniosek ten jest sugerowany przez wystąpienie większej metylacji DNA we krwi pępowinowej w stosunku do występującej hipometylacji tego regionu DNA u dorosłych. Próbkę krwi pępowinowej pochodzące od matek z zaburzeniami afektywnymi wykazały wyższą metylację DNA w sposób specyficzny dla genotypu - zwiększony efekt dla genotypu TT. Sugeruje to, że in utero określony genotyp może być bardziej wrażliwy na zmiany środowiskowe niż w czasie trwania innych etapów rozwojowych. Niestety powyższe badania przeprowadzone było na niewielkiej grupie badawczej – na 60 ciężarnych. (Duis i in. 2018).

4. Podsumowanie

Obserwujemy pojawianie się wielu nowych publikacji na temat genu FKBP5 omawianego w tym artykule. Świadczy to o dużym zainteresowaniu naukowców tematem potencjalnej możliwości wykorzystania wiedzy o mechanizmie jego działania. Istotne okazują się również epigenetyczne zmiany, którym podlega.

Analizując wybrane artykuły naukowe zajmujące się tematem genu FKBP5 i jego polimorfizmów można zauważyć, że pełni on rolę w patogenezie i regulacji wielu procesów chorobotwórczych związanych ze stresem. Kodująca przez niego lipofilina może zostać w przyszłości wykorzystana, jako punkt uchwytu leków przy leczeniu schorzeń takich jak depresja czy zespół stresu pourazowego. Konieczne są dalsze badania pozwalające w pełni wyjaśnić rolę genu FKBP5 w organizmie ludzkim.

5. Literatura

- Bortsov AV1, Smith JE, Diatchenko Li in (2013) Polymorphisms in the glucocorticoid receptor co-chaperone FKBP5 predict persistent musculoskeletal pain after traumatic stress exposure. *Pain* 154(8)
- Criado-Marrero M, Gebru NT, Gould LA i in. (2019) Early Life Stress and High FKBP5 Interact to Increase Anxiety-Like Symptoms through Altered AKT Signaling in the Dorsal Hippocampus. *International Journal of Molecular Sciences* 20(11)
- Duis J, Cox OH, Ji Y i in (2018) Effect of Genotype and Maternal Affective Disorder on Intronic Methylation of FK506 Binding Protein 5 in Cord Blood DNA. *Frontiers in genetics*. 9:648
- Hartmann J, Wagner KV, Liebl C, i in (2012) The involvement of FK506-binding protein 51 (FKBP5) in the behavioral and neuroendocrine effects of chronic social defeat stress. *Neuropharmacology* 62(1)
- Jaksic N, Šabić Džananović E, Aukst Margetic B i in (2019) A Candidate Gene Association Study of FKBP5 and CRHR1 Polymorphisms in Relation to War-Related Posttraumatic Stress Disorder. *Psychiatria Danubina* 31(2):269-275
- Kuan PF, Yang X, Clousto S i in. (2019) Cell type-specific gene expression patterns associated with posttraumatic stress disorder in World Trade Center responders. *Translational Psychiatry* 9(1):1
- Kwon J, Kim YJ, Choi K (2019) Identification of stress resilience module by weighted gene co-expression network analysis in Fkbp5-deficient mice. *Molecular Brain* 12(1):99
- Linnstaedt SD, Riker KD, Rueckels CA, i in (2018) A Functional riboSNitch in the 3' Untranslated Region of FKBP5 Alters MicroRNA-320a Binding Efficiency and Mediates Vulnerability to Chronic Post-Traumatic Pain. *The Journal of neuroscience* 38(39)
- Lovallo WR, Acheson A, Cohoon AJ i in (2019) Working memory reflects vulnerability to early life adversity as a risk factor for substance use disorder in the FKBP5 cortisol co-chaperone polymorphism, rs9296158, *PLoS One* 14(6)
- Löbel M, Mooslechner AA, Bauer S i in (2015) Polymorphism in COMT is associated with IgG3 subclass level and susceptibility to infection in patients with chronic fatigue syndrome. *Journal of translational medicine* 13(264)
- Mahon PB, Zandi PP, Potash JB i in. (2013) Genetic association of FKBP5 and CRHR1 with cortisol response to acute psychosocial stress in healthy adults. *Psychopharmacology* 227(2)

- Matsudaira I, Oba K, Takeuchi H i in. (2019) rs1360780 of the FKBP5 gene modulates the association between maternal acceptance and regional gray matter volume in the thalamus in children and adolescents. PLoS One 14(8): e0221768
- Mikolas P, Tozzi L, Doolin K (2019) Effects of early life adversity and FKBP5 genotype on hippocampal subfields volume in major depression. Journal of Affective Disorders 252:152-159
- Sabbagh JJ, Cordova RA, Zheng D i in (2018) Targeting the FKBP51/GR/Hsp90 Complex to Identify Functionally Relevant Treatments for Depression and PTSD. American Chemical Society Chemical Biology 13(8):2288-2299.
- Zhang K, Wang L, Li G i in. (2019) Correlation between hypothalamic-pituitary-adrenal axis gene polymorphisms and posttraumatic stress disorder symptoms. Hormones and Behaviour 117: 104604

9. Rola białka c-FLIP w patogenezie łuszczycy

The role of c-FLIP protein in the pathogenesis of psoriasis

Miśkiewicz Joanna⁽¹⁾, Strzelec Karolina⁽¹⁾, Krawczyk Agata⁽²⁾, Kimsa-Dudek Magdalena⁽²⁾,
Strzałka-Mrozik Barbara⁽¹⁾

⁽¹⁾ Zakład Biologii Molekularnej Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾ Zakład Nutrigenomiki i Bromatologii Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Barbara Strzałka-Mrozik

Miśkiewicz Joanna: joanna.miskiewicz@med.sum.edu.pl

Słowa kluczowe: apoptoza, białko c-FLIP, kaspaza 8

Streszczenie

Łuszczycyca jest przewlekłą, zapalną i nawracającą chorobą skóry charakteryzującą się zaburzeniem proliferacji i różnicowaniem keratynocytów. Klinicznym objawem schorzenia jest występowanie blaszek łuszczycowych a poza zmianami skórnymi, u części pacjentów odnotowuje się zajęcie innych narządów. Złożona etiopatogeneza tej spondyloartropatii opiera się na czynnikach genetycznych, epigenetycznych, immunologicznych oraz środowiskowych. Łuszczycę charakteryzują trzy ważne mechanizmy: hiperprolifracja keratynocytów z ich nieprawidłowym różnicowaniem oraz obecność stanu zapalnego. Patogeny mechanizm hiperprolifracji keratynocytów nie został ostatecznie wyjaśniony jednak sugeruje się znaczącą rolę zaburzenia programowanej śmierci komórki. W procesie apoptozy uczestniczy wiele czynników w tym antyapoptotyczne białko c-FLIP, strukturalnie spokrewnione z kaspazą 8 ale bez aktywności proteolitycznej, występujące jako trzy funkcjonalne izoformy. Białko c-FLIP wykazuje zdolność wiązania się do kompleksu zawierającego białko FADD blokując rekrutację i aktywację kaspazy-8. W wyniku związania ligandu z odpowiednim receptorem śmierci, dochodzi także do oddziaływania białka c-FLIP z białkiem RAF1 oraz RIP co aktywuje czynnik NF-κB oraz ścieżkę ERK, promując przeżycie komórki. Tym samym, wiele badań dotyczących roli białka c-FLIP w etiologii łuszczycy, sugeruje jego znaczącą rolę w powstaniu i rozwoju omawianego schorzenia udowadniając istotnie zwiększoną ekspresję genu *CFLAR* kodującego białko c-FLIP. Badania związane z zastosowanym leczeniem udowadniają ponadto, korelację pomiędzy poziomem wspomnianego białka a manifestacjami klinicznymi.

1. Łuszczycyca

Łuszczycyca jest przewlekłą chorobą zapalną skóry charakteryzującą się zaburzeniem różnicowania keratynocytów z hiperprolifracją naskórka oraz klinicznym występowaniem blaszek łuszczycowych. U wielu pacjentów choroba objawia się nie tylko zmianami skórnymi, ale również zajęciem innych narządów. Szacuje się, że u 5-30% pacjentów oprócz objawowej łuszczycy rozwija się łuszczycowe zapalenie stawów. Etiopatogeneza schorzenia nie jest w pełni poznana, stąd sugeruje się udział czynników genetycznych, immunologicznych i środowiskowych. Znanych jest ponad 20 *loci* związanych z możliwością rozwoju łuszczycy. Ponadto, istotną rolę odgrywają czynniki epigenetyczne tj.: hipermetylacja DNA w zmianach łuszczycowych, nieprawidłowa ekspresja mikroRNA (miRNA) będących jednoniciowymi cząsteczkami RNA wpływających dodatnio lub ujemnie na ekspresję innych genów oraz hipoacetylację histonu H4. Wśród czynników środowiskowych wyróżnia się: zakażenia bakteryjne, wirusowe, leki, alkohol, stres oraz nikotynę (Owczarczyk-Saczonek i Placek 2014).

Z uwagi na obserwowane w łuszczycy liczne zaburzenia immunotolerancji, chorobę zalicza się do kręgu schorzeń autoimmunologicznych. Decydującą rolę w rozwoju łuszczycy odgrywa aktywacja osi IL-12/Th1/IFN-γ oraz Th17/IL-23. Interleukina 12 uczestniczy w różnicowaniu Th1

a tym samym w reakcjach autoagresji mediowanych przez wspomniane komórki. Interleukina 23 wpływa na podtrzymanie reakcji zapalnej mediowanej przez Th1, na utrzymanie puli komórek zapalnych a także na dojrzewanie Th17. Ponadto, obserwuje się zaburzenia funkcji limfocytów Treg niszczących limfocyty autoreaktywne w warunkach fizjologicznych. Dowiedziono również, że keratynocyty łuszczykowe wykazują hiperproliferyzację z niepełnym różnicowaniem i znaczną opornością na proces apoptozy (Owczarczyk-Saczonek i Placek 2014).

2. Apoptoza

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki, jest fizjologicznym procesem warunkującym prawidłową czynność organizmu, przebiegającym zawsze według ściśle określonego schematu. Pierwszym etapem są zmiany w jądrze komórkowym gdzie chromatyna ulega kondensacji, umiejscowieniu pod błoną komórkową a następnie obkurczeniu i fragmentacji jądra. W następnym etapie dochodzi do kondensacji cytoplazmy a także utworzenia pęcherzyków na komórce. Uwypuklenia błony komórkowej tworzą tzw. ciała apoptotyczne zawierające chromatynę, cytoplazmę i organella. Ostatnim etapem jest fagocytoza ciałek apoptotycznych. Apoptoza może przebiegać w różny sposób angażując odmienne organelle komórkowe. Najlepiej poznanymi ścieżkami apoptozy są: związany z błoną komórkową szlak zewnętrzny, tzw. szlak receptorowy oraz związany z udziałem mitochondrium, szlak wewnątrzkomórkowy. Innymi poznanymi szlakami apoptozy jest szlak pseudoreceptorowy wykorzystujący perforyny i granzym B oraz szlak siateczkowy, indukowany stresem wykorzystujący retikulum endoplazmatyczne (Paduch i in. 2015; Stępień i in. 2007).

2.1 Wewnętrzny szlak apoptozy

Wewnętrzny szlak apoptozy, nazywany również mitochondrialnym, ulega aktywacji na skutek m.in. stresu oksydacyjnego, uszkodzeń DNA, zaburzeń transportu elektronów, wzrostu stężenia reaktywnych form tlenu, a także jonów wapnia (Ockner 2001; Stępień i in. 2007). Szlak ten przebiega z udziałem mitochondrium a najważniejszym jego elementem są megakanały (ang. *permeability transition pore*, PTP) utworzone na styku dwóch błon mitochondrialnych. Pory mitochondrialne powstają prawdopodobnie z translokazy nukleotydów adeninowych (ANT) w błonie wewnętrznej oraz kanału anionowego VDAC (ang. *voltage-dependent anion channel*) regulowanego przez zmiany potencjału błonowego i BRP (obwodowy receptor benzodiazepiny) zlokalizowany w błonie zewnętrznej. W wyniku otwarcia kanałów mitochondrialnych pod wpływem określonych czynników dochodzi do uwolnienia cytochromu c (Stępień i in. 2007; Kroemer 2003). Kolejną hipotezą dotyczącą modelu budowy i powstawania porów mitochondrialnych jest wyłączenie działania translokazy nukleotydów adeninowych wewnętrznej błony mitochondrialnej z pęczniącym matriks, co powoduje przerwanie zewnętrznej błony mitochondrialnej (Stępień i in. 2007). Czynniki sprzyjającymi przedstawionemu procesowi są jony wapnia oraz palmityniany, a także oddziałujące bezpośrednio z ANT białka Bax, Bak, Bcl-2 (Stępień i in. 2007; Marzo i in. 1998). Inne znane teorie to permeabilizacja zewnętrznej błony mitochondrialnej z oddziaływaniem VDAC oraz białka Bax a także indywidualne działanie białka Bax (Stępień i in. 2007). Wynikiem wszystkich przedstawionych hipotez ostatecznie jest uwolnienie z mitochondrium cytochromu c, który łączy się z nieaktywną kaspazą 9 oraz czynnikiem Apaf 1 tworząc strukturę nazywaną kołem śmierci lub apoptosomem. Powstały kompleks aktywuje kaspazę 9 dalej indukującą działanie kolejnych kaspaz wykonawczych (Stępień i in. 2007; Kroemer 2003).

Mitochondrialny szlak apoptozy jest regulowany przez wiele czynników w tym przez białka z rodziny Bcl-2 do których zaliczamy zarówno inhibitory apoptozy – Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, jak i białka proapoptyczne – Bid, Bad, Bak, Bax, Noxa (Stępień i in. 2007; Borner 2003). Ponadto do czynników antyapoptotycznych można zaliczyć białka IAP a do proapoptotycznych białko p53 (Stępień i in. 2007).

2.2 Zewnątrzkomórkowy szlak apoptozy

Proces programowanej śmierci komórki przebiegający szlakiem zewnątrzkomórkowym (receptorowym) jest związany z receptorami błonowymi oraz ich ligandami. Do wspomnianych

receptorów zaliczamy białka nadrodziny receptorów czynnika martwicy nowotworu TNF (ang. *tumor necrosis factor*) – TNFR1(p55TNF-R), TNFR2(p75TNF-R), Fas/APO-1/CD95, DR-3/TRAMP, DR-4/TRAIL-R1, DR-5/TRAIL-2. W wyniku połączenia odpowiedniego liganda z receptorem dochodzi do przekazania sygnału do białka adaptorowego FADD (ang. *fas-associated death domain*), który poprzez domenę śmierci (ang. *death domain*, DD) zlokalizowaną na C-końcu, łączy się z domeną śmierci receptora. Ponadto, występująca na N-końcu łańcucha polipeptydowego FADD, domena śmierci łączy się z odcinkiem DED białek efektorowych: prokaspazy 8 lub 10 (Stępień i in. 2007; Paduch i in. 2015). Do przekazania sygnału niezbędne jest również przyłączenie przy udziale białka TRADD (ang. *TNFR-associated death domain*), białka RIP (ang. *receptor-interacting protein*) (Stępień i in. 2007; Paduch i in. 2015).

3. Białko C-FLIP w luszczycy

3.1 Struktura białka c-FLIP

Białko c-FLIP (ang. *cellular fllice-like inhibitory protein*) jest białkiem antyapoptocycznym, należącym do rodziny białek FLIP, zawierającym w swojej strukturze domenę śmierci (ang. *death effector domain*, DED). Gen kodujący białko c-FLIP, nazwany *CFLAR*, znajduje się na ludzkim chromosomie 2q33-34, ma długość 50Kb i jest przestrzennie oddzielony 10 intronami. Wyróżnia się 13 wariantów splicingowych białka c-FLIP, w tym trzy główne izoformy ludzkie: c-FLIP_S, c-FLIP_R oraz c-FLIP_L (Safa 2012). Forma c-FLIP_L to białko o masie 55kDa, zawierające dwie domeny DED na N-końcu łańcucha polipeptydowego oraz domenę podobną do kaspazy na C-końcowym odcinku łańcucha. Pomimo podobnej organizacji domen do prokaspazy 8, omawiana izoforma nie ma w strukturze domen katalitycznych, stąd nie wykazuje aktywności proteolitycznej kaspazy. C-FLIP_S to izoforma o masie 27 kDa złożona z dwóch domen DED natomiast c-FLIP_R jest izoformą o masie 25 kDa (Tsuchiya i in. 2015). Powstanie konkretnej izoformy białka c-FLIP jest zależne od polimorfizmu pojedynczego nukleotydu, nazwanego rs10190751. Ponadto, wszystkie trzy izoformy białka c-FLIP wykazują zdolność tworzenia heterodimerów z kaspazą 8 poprzez interakcję domen DED (Tsuchiya i in. 2015; Ueffing i in. 2009). Regiony C-końcowe form c-FLIP_S oraz c-FLIP_R odgrywają szczególną rolę w ubikwitynacji i degradacji oraz ich funkcji przeciwapoptocycznej (Safa 2012).

Ekspresja genu kodującego białko c-FLIP jest regulowana zarówno na poziomie transkrypcyjnym, translacyjnym jak i potranslacyjnym. Wielokrotnie wykazano, że izoformy tego białka są regulowane w sposób zależny od rodzaju sygnału jak i określonej komórki. Transkrypcję genu białka c-FLIP indukują takie czynniki jak: NFATc2, EGR1, AR i SP1, NF-kB, P53, FoxO, CREB, AP-1 (cFos / c-Jun), natomiast w hamowaniu transkrypcji biorą udział: c-myc, FoxO3a, c-Fos, IRF5 i SP3 (Safa 2013; Tsuchiya i in. 2015; Subramaniama i in. 2013). Ponadto, warto zwrócić uwagę na brak korelacji pomiędzy ilością transkryptu c-FLIP a poziomem białka w komórce. Fakt ten wynika nie tylko z krótkiego okresu półtrwania tego białka w komórce, ale również z obróbki potranskrypcyjnej. Wykazano, że na poziom białka c-FLIP wpływają cząsteczki miRNA będące małymi jednoniciowymi cząsteczkami RNA o długości od 21 do 23 nukleotydów mającymi zdolność negatywnej lub pozytywnej regulacji genów. Wskazuje się m.in. na rolę miR-512-3p w indukcji apoptozy, poprzez hamowanie ekspresji genu białka c-FLIP. Wskazuje się także na rolę nadtlenu wodoru w indukcji ubikwitynacji białka cFLIP celem jego proteasomalnej degradacji (Wang i in. 2008; Subramaniama i in. 2013).

3.2 C-FLIP w regulacji szlaku receptorowego apoptozy

Ścieżka zewnątrzkomórkowego szlaku apoptozy rozpoczyna się w chwili połączenia ligandu z receptorem śmierci na powierzchni komórki. W wyniku tego dochodzi do asocjacji białek adaptorowych: domeny śmierci związanej z Fas (FADD) lub domeny śmierci związanej z receptorem TNF (TRADD) do receptora poprzez obecną na C-końcu domenę DD. Następnie białko adaptorowe poprzez domenę DED na N-końcu łączy się z prokaspazą 8 tworząc kompleks DISC. W kolejnych etapach dochodzi do powstania aktywnej formy kaspazy 8 na drodze homotypowej dimeryzacji prokaspazy 8 i autokatalitycznej aktywacji proteolitycznej do częściowo czynnej proteazy. W kolejnym etapie zachodzi dalsza transkatalityczna aktywacja proteolityczna w wyniku czego

powstaje w pełni aktywna proteaza cysteinowa zdolna do translokacji i uaktywnienia kaspaz wykonawczych apoptozy (kaspazy 3,6,7). Pod względem strukturalnym białka z rodziny c-FLIP i prokaspaza 8 są do siebie podobne z uwagi na obecność dwóch domen DED. Białko c-FLIP może więc łączyć się z domeną DED białka FADD uniemożliwiając prokaspazie 8 proteolityczną autoaktywację (Pająk i Orzechowski 2005; French i Tschopp 1999).

Prokaspaza 8 składa się z czynnej katalitycznej domeny kaspazowej w skład której wchodzi podjednostka p20(p18) oraz p10 niezbędne do utworzenia czynnego heterotetrameru (Pająk i Orzechowski 2005; French i Tschopp 1999). C-FLIP_S oraz c-FLIP_R ulegają przyłączeniu do kompleksu DISC; tworzą heterodimery z prokaspazą 8. C-FLIP_S całkowicie blokuje aktywację prokaspazy 8, natomiast w przypadku c-FLIP_L dochodzi do częściowej aktywacji do formy, która nie jest zdolna do indukcji apoptozy. W wyniku częściowej aktywacji, sam c-FLIP_L ulega podziałowi w pozycji Asp-376 na dwa fragmenty: C-terminalny FLIP(p12) ulegający uwolnieniu oraz N-terminalny FLIP(p43). W wyniku tego procesu nieprzetworzony c-FLIP_L oraz FLIP(p43) tworzą heterodimery z kaspazą 8 powodując jej sekwestrację w pobliżu receptora oraz ograniczając jej pełną aktywację, co w konsekwencji powoduje, że nie może ona oddziaływać na kaspazy efektorowe i powodować przetwarzania składowych kompleksu DISC np. RIP (Pająk i Orzechowski 2005; Micheau i in. 2002).

Białko c-FLIP poza hamowaniem szlaku apoptozy, który zależy od kompleksu DISC, zwiększa znacząco przeżywalność komórek poprzez aktywację antyapoptotycznego czynnika NF-κB. Wskazany czynnik aktywuje geny takich białek jak: Bcl-2/A1, TRAF-1, TRAF-2, IAP-1 oraz IAP-2. Aktywność czynnika NF-κB podlega regulacji przez białka inhibujące IκB. W wyniku fosforylacji przez kinazę IKK-γ, odłączenie, ubikwitynację i proteosomalną degradację, inhibitor nie hamuje przemieszczania się NF-κB do jądra komórkowego w wyniku czego jest indukowana transkrypcja genów poprzez NF-κB (Safa i in. 2008).

3.3 Manifestacja c-FLIP w łuszczycy

Charakterystyczną cechą keratynocytów łuszczycowych jest ich hiperproliferaacja, stąd zakłada się, że w rozwoju łuszczycy dochodzi do zaburzenia regulacji szlaków przeżycia komórki i supresji apoptozy. Wielokrotnie wykazano znaczący wzrost poziomu inhibitorów apoptotycznych w łuszczycy. Istnieje niewiele dowodów na związek zwiększonej ekspresji białka c-FLIP z manifestacją kliniczną łuszczycy. Zakłada się jednak, że antyapoptotyczne białko c-FLIP, ze względu na znaczą homologię strukturalną z prokaspazą 8, chroni keratynocyty łuszczycowe przed apoptozą indukowaną receptorami śmierci. Imam i wsp. poddali analizie poziom mRNA omawianego inhibitora apoptozy – białka c-FLIP, u pacjentów z łuszczycą zwykłą od których pobrano po dwa materiały biopsyjne: jeden z fragmentów skóry objętej zmianami łuszczycowymi (próba badana), oraz jeden z fragmentu skóry co najmniej 1cm od zmiany (próba kontrolna). Stwierdzono znacząco wyższy poziom mRNA c-FLIP w komórkach pochodzących ze zmian łuszczycowych w porównaniu z poziomem mRNA tego białka w komórkach nie objętych zmianami, co potwierdza znaczącą rolę c-FLIP w rozwoju choroby. Ponadto, wykazano istotną, dodatnią korelację między ekspresją genu kodującego białko c-FLIP w naskórku zmienionym chorobowo a wynikami wskaźnika PASI, wskazując na silny związek poziomu ekspresji białka z klinicznym nasileniem choroby. Autorzy badań nie wykazali istotnej korelacji między poziomem białka c-FLIP a takimi czynnikami jak: wiek chorego, płeć, wiek w chwili początku choroby, czas trwania łuszczycy oraz rodzaj zakażenia poprzedzającego schorzenie (Imam i in. 2013).

W kolejnych badaniach poddano ocenie ekspresję genu kodującego białko c-FLIP u pacjentów chorych na łuszczycę oraz u osób bez dysfunkcji dermatologicznych. Yang i wsp. stosując RT-PCR oraz barwienie immunohistochemiczne wykazali silną ekspresję we wszystkich warstwach naskórka, skóry objętej zmianami łuszczycowymi w porównaniu z naskórkiem zdrowym. Ponadto, poziom c-FLIP korelował z wartością wskaźnika PASI oraz wartością wskaźnika apoptozy. Wnioskowano więc, że nadekspresja c-FLIP przyczynia się do nieprawidłowej proliferacji keratynocytów z powodu funkcjonalnego hamowania szlaku apoptotycznego (Yang i in. 2009). Podobne wyniki uzyskali Hewedy i wsp., którzy poddali badaniu czterdziestu pacjentów z łuszczycą wykazując zwiększoną ekspresję genu białka c-FLIP. U osób bez dysfunkcji dermatologicznych,

stanowiących grupę kontrolną, obserwowano negatywną lub słabą ekspresję tego genu. Podobnie jak w przypadku wyników badań uzyskanych przez Yang i wsp., wykazano istotną, dodatnią korelację między wartościami wskaźnika PASI a poziomem ekspresji genu białka c-FLIP (Hewedy i in. 2017).

Obecnie dostępne są leki przeciwluszczycowe mające na celu hamowanie proliferacji keratynocytów oraz pobudzenie szlaku apoptozy. Do leków wykazujących wspomniane działanie należą: propylotiouracyl, steroidy, cyklosporyna A, metotreksat (MTX) oraz kalkypotriol. Metotreksat, antagonistą kwasu foliowego, jest najczęściej stosowanym środkiem w leczeniu łuszczycy stąd przeprowadza się wiele badań mających na celu wyjaśnienie skuteczności działania MTX na regulację apoptozy. Elango i wsp. przeprowadzili badania dotyczące skuteczności leczenia metotreksatem u pacjentów z łuszczycą badając m.in. ekspresję białka c-FLIP przed podaniem leku i po zakończeniu leczenia. Ostatecznie wykazano znaczące obniżenie ekspresji genu kodującego białko c-FLIP po 12miesiącach stosowanego leczenia co spowodowało normalizację procesu apoptozy. Redukcja poziomu białka c-FLIP prowadzi również do obniżenia aktywacji NF- κ B, a następnie aktywacji białek apoptotycznych. Ponadto, we wskazanych badaniach stwierdzono wzrost aktywności kaspazy 9 oraz obniżenie ekspresji białek Bcl-xl, NF κ Bp65 oraz pAkt1. Wykazane skutki zastosowanego leczenia jednoznacznie udowadniają proapoptotyczne działanie metotreksatu (Elango i in. 2017).

4. Podsumowanie

Molekularne podstawy procesów zaburzeń proliferacji i różnicowania keratynocytów umożliwiają zrozumienie powstawania i rozwoju łuszczycy. Okazuje się, iż wiele czynników wpływa na utratę fizjologicznej funkcji apoptozy komórki jaką jest eliminacja uszkodzonych komórek. Jednym z czynników powodujących zatrzymanie programowanej śmierci komórki jest białko c-FLIP, które w zależności od izoformy blokuje aktywację kaspazy 8 (izoforma c-FLIP_s) całkowicie lub tylko częściowo (c-FLIP_L). Przeprowadzone badania, u chorych na łuszczycę, udowadniają znaczny wpływ nadekspresji c-FLIP na manifestację kliniczną choroby. Ponadto wykazano, że w wyniku zastosowanego leczenia dochodzi do hamowania ekspresji genu kodującego to białko, powodując normalizację procesu apoptozy. Sugeruje to, że zarówno gen *CFLAR* jak i samo białko c-FLIP mogą w przyszłości stać się jednym z celów terapeutycznych stosowanych w łuszczycy.

5. Bibliografia

- Borner C. (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology*, 39: 615–647
- Elango T, Thirupathi A, Subramanian S. et al. (2017) Methotrexate treatment provokes apoptosis of proliferating keratinocyte in psoriasis patients. *Clinical and Experimental Medicine*, 17(3):371–381.
- Hewedy ES, Hassan GF, Sallam FA. (2017) Cutaneous expression of antiapoptotic protein c-FLIP in psoriasis. *Esperienze Dermatologiche*; 19(2-4):60-65.
- French LE, Tschopp J. (1999) Inhibition of death receptor signaling by FLICE-inhibitory protein as a mechanism for immune escape of tumors. *Journal of Experimental Medicine*. 190(7): 891–893
- Imam AA, El-Hefnawy AH, El-Sayed SB, Ibrahim SH. (2013) The expression pattern of antiapoptotic protein c-FLIP in psoriatic epidermis. *The Egyptian Journal of Dermatology and Venerology*. 33(2):46-50.
- Kroemer G. (2003) Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 304(3): 433–435.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. (1998) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, 281(5385): 2027–2031
- Micheau O, Thome M, Schneider P, et al. (2002) Long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47): 45162–45167.
- Ockner RK. (2001) Apoptosis and liver diseases: recent concepts of mechanism and significance. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 16(3): 248–260.

- Owczarczyk-Saczonek A, Placek W. (2014) Łuszczyca jako choroba autoimmunologiczna. *Przegląd Dermatologiczny*, 101(4): 278-287.
- Paduch R, Klatka M, Klatka J. (2015) Rodzaje śmierci komórki. *Pomeranian Journal of Life Sciences*, 61(4): 411–418.
- Pająk B, Orzechowski A (2005) FLIP – przeciwnik, który może przegrać pojedynek w walce z czynnikami swoście hamującymi translację. *Postęp Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 59: 140-149.
- Safa AR. (2012) C-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Experimental oncology*. 34(3): 176-184.
- Safa AR. (2013) Roles of c-FLIP in apoptosis, necroptosis, and autophagy. *Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis*, Suppl 6: 003.
- Safa AR, Day TW, Wu CH. (2008) Cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP): A novel target for cancer therapy. *Current Cancer Drug Targets*, 8(1): 37–46.
- Stępień A, Izdebska M, Grzanka A. (2007) Rodzaje śmierci komórki. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*. 61: 420-428.
- Subramaniama K, Hirparaa JL, Tucker-Kellogg L. et al. (2013) FLIP: A flop for execution signals. *Cancer Letters*, 332:151–155.
- Tsuchiya Y, Nakabayashi O, Nakano H. (2015) FLIP the Switch: Regulation of Apoptosis and Necroptosis by cFLIP. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12): 30321–30341.
- Ueffing N, Singh KK, Christians A. et al. (2009) A single nucleotide polymorphism determines protein isoform production of the human c-FLIP protein. *Blood*, 114(3): 572–579.
- Wang L, Azad N, Kongkaneromit L. et al. (2008) The Fas death signaling pathway connecting reactive oxygen species generation and FLICE inhibitory protein down-regulation. *The Journal of Immunology*, 180 (5): 3072–3080.
- Yang J, Li Y, Liu YQ, et al. (2009) Expression of antiapoptotic protein c-FLIP is upregulated in psoriasis epidermis. *European Journal of Dermatology*. 19(1):29–33.

10. MikroRNA jako istotny czynnik regulacji apoptozy za pośrednictwem białka p53

MicroRNA as an important factor in the regulation of apoptosis using p53 protein

Miśkiewicz Joanna ⁽¹⁾, Strzelec Karolina ⁽¹⁾, Krawczyk Agata ⁽²⁾, Strzałka-Mrozik Barbara⁽¹⁾

⁽¹⁾ Zakład Biologii Molekularnej Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾ Zakład Nutrigenomiki i Bromatologii Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Barbara Strzałka-Mrozik

Miśkiewicz Joanna: joanna.miskiewicz@med.sum.edu.pl

Słowa kluczowe: programowana śmierć komórki, miRNA, ekspresja genów

Streszczenie

MikroRNA (miRNA) to krótkie, niekodujące cząsteczki RNA o długości 18-24 nukleotydów. MiRNA wykazuje w postaci dojrzałej zdolność kontroli ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. Dojrzałe miRNA wchodząc w skład kompleksu RISC (ang. *RNA induced silencing complex*) biorącemu udział w wyciszaniu ekspresji genów, kontroluje translację docelowego mRNA, implikując jego zahamowanie w przypadku niepełnej komplementarności obu cząsteczek lub całkowitą degradację docelowego mRNA w przypadku pełnej komplementarności. Potwierdzono, iż cząsteczki miRNA wykazują zdolność kontroli procesu programowanej śmierci komórki za pośrednictwem jednego z czynników proapoptotycznych – p53. Białko p53 kontroluje główne szlaki indukujące apoptozę poprzez oddziaływanie m.in. z genem kodującym proapoptotyczne białko Bax, genem *Noxa* oraz *PUMA*. Ponadto p53 aktywuje geny *PIGs* oraz jest zaangażowane w ścieżki zależne od receptorów śmierci i ekspresję receptora FAS. Białko p53 podlega regulacji bezpośredniej lub pośredniej przez cząsteczki miRNA takie jak: miR125b, miR504, miR-34a, miR29 oraz miR122.

1. Biogeneza miRNA

MikroRNA (miRNA) to krótkie, regulatorowe cząsteczki RNA, o długości 18-24 nukleotydów, wpływające na aktywność określonych cząsteczek matrycowego RNA (mRNA). MiRNA odgrywają szczególną rolę w procesach zarówno fizjologicznych jak i patologicznych, takich jak: erytropoeza, apoptoza, różnicowanie komórek macierzystych układu krwiotwórczego, angiogeneza, neurogeneza czy onkogeneza (Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010). Geny dla miRNA mieszczą się w intronach, egzonach genów strukturalnych lub obszarach międzygenowych i są w większości transkrybowane przez polimerazę II. Jednakże opisano również kilka miRNA ulegających transkrypcji przy udziale polimerazy III (Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010; Li i in. 2007; Filip 2007). Produkt opisanej transkrypcji określa się jako pri-miRNA i posiada na końcu 5' czapkę (ang. *cap*) z 7-metyloguanozyny i ogon złożony z poli-A na końcu 3'. Wielkość pierwotnego transkryptu pri-miRNA wynosi do kilku kb. W jego obrębie występuje fragment złożony z 60-70 nt, przyjmujący strukturę tzw. „spinki do włosów” będącej dwuniciowym fragmentem przedzielonym pętlą niesparowanych nukleotydów. Dojrzewanie pri-miRNA związane jest z działaniem dwóch enzymów z rodziny rybonukleazy II: enzymu Drosha i Dicer (Filip 2007; Ouellet i in. 2006; Filip 2006).

Enzym Drosha jest endonukleazą klasy II, zawierającą podwójną domenę RNazy III (RIIID), domenę wiążącą dwuniciowe DNA (dsDNA) na końcu C, obszar bogaty w reszty proliny (PRR) oraz na końcu N - domeny bogate w reszty argininy i seryny (RS). Kofaktorem dla enzymu Drosha jest białko DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome Critical Region 8*) decydujące o specyficzności endonukleazy (Filip 2007; Ouellet i in. 2006; Filip 2006). Domeny RIIID mają zdolność tworzenia

wewnątrzcząsteczkowego dimeru, co umożliwia przecięcie pri-miRNA u podstawy struktury „spinki do włosów”, tworząc pre-miRNA o długości ~ 70nt. Domena RIIIDa przecina część 5', natomiast domena RIIIDb tnie część 3' transkryptu. Prowadzi to do powstania pre-miRNA posiadającego na końcu 5' grupę fosforanową a na końcu 3' dwa niesparowane nukleotydy (Filip 2007; Ouellet i in. 2006). W kolejnym etapie cząsteczka pre-miRNA przechodzi do cytoplazmy po połączeniu z jądrowym białkiem transportowym Exportin-5 (Filip 2007; Chendrimada i in. 2007).

Enzym Dicer jest dużym białkiem (~200 kDa) występującym głównie w cytoplazmie i w obszarze siateczki śródplazmatycznej. Zawiera kilka domen, w tym: N-końcową o aktywności ATPazy/helikazy, domenę DUF283, domenę PAZ (PIWI/Ago/Zwolle) oraz C-końcową RIIID złożoną z domeny dsRBD i z dwóch domen katalitycznych wykazujących aktywność RNazy III (Filip 2007; Ouellet i in. 2006; Filip 2006). Dicer jest zależny od ATP i wykazuje silne powinowactwo do dsRNA zawierającego na końcu 3' dwa niesparowane nukleotydy rozpoznawane przez domenę PAZ (Filip 2007; Ouellet i in. 2006; Zhang i in. 2007). Uważa się, że każda z domen katalitycznych RIIID tnie łańcuch pre-miRNA tworząc przejściową, dwuniciową formę, przy czym długość powstałych łańcuchów RNA wynosi ~ 21nt (Filip 2007; Ouellet i in. 2006).

Aktywność Dicer jest determinowana przez szereg białek towarzyszących tj. TRBP (ang. *transactivating response RNA-binding protein*), Ago2 należące do rodziny białek Agronaut, białko FMRO (ang. *fragile X mental retardation protein*) oraz białko PACT (ang. *protein kinase R activating enzyme*). W wyniku działania enzymu Dicer powstaje nietrwała, dwuniciowa forma miRNA, ulegająca rozdzieleniu. Jeden z łańcuchów ulega włączeniu w kompleks RISC (ang. *RNA induced silencing complex*) – białkowy kompleks o aktywności specyficznej nukleazy umożliwiając ukierunkowanie do docelowego mRNA, natomiast drugi łańcuch ulega degradacji (Filip 2007).

Dojrzałe miRNA, włączone w kompleks RISC, wykazują zdolność oddziaływania na poziom ekspresji mRNA genu docelowego w sposób dwojaki, w zależności od komplementarności obu cząsteczek. W wyniku pełnej komplementarności, związanie regionu 3' UTR mRNA z miRNA, prowadzi do przecięcia matrycowego RNA w obrębie RISC pomiędzy sparowanymi z 10 i 11 nukleotydem cząsteczki miRNA licząc od końca 5'. Z kolei jedynie hamowanie translacji nie zależy od pełnej komplementarności miRNA z mRNA a zachodzi w skutek przyłączenia miRNA do regionu 3' UTR mRNA, przy czym poziom transkryptu nie ulega obniżeniu (Filip 2007; Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010).

2. Apoptoza

Apoptoza jest definiowana jako aktywny, fizjologiczny proces uruchamiany po zadziałaniu odpowiedniego bodźca indukującego jeden ze szlaków programowanej śmierci komórki. Głównymi szlakami apoptotycznymi jest szlak zewnątrzpochozny i wewnątrzpochozny.

Zewnątrzpochozny szlak apoptozy tzw. szlak receptorowy, jest indukowany w chwili połączenia ligandu z jego błonowym receptorem śmierci. Do najliczniejszej grupy wspomnianego typu receptorów należy rodzina receptorów czynnika martwicy nowotworów TNFR: TNFR1, TNFR2, Fas/CD95/Apo1 lub TRAIL/Apo2, które zbudowane są z domen: cytoplazmatycznej, transbłonowej i zewnątrzkomórkowej. Po połączeniu receptora z odpowiednim ligandem (TNF- α , FasL, TRAIL/Apo2L) dochodzi do przekazania sygnału do białka FADD (ang. *fas-associated death domain*) zawierającego na C-końcu domenę śmierci DD (ang. *death domain*), dzięki której łączy się z domeną DD receptora. Obecna na N-końcu łańcucha polipeptydowego białka FADD domena śmierci, łączy się z domeną DED prokaspazy 8 lub 10. Aktywacja kaspaz efektorowych indukuje ostatecznie kaspazy wykonawcze, prowadzące do śmierci komórki (Paduch i in. 2015; Stępień i in. 2007).

Szlak wewnątrzpochozny (mitochondrialny) ulega aktywacji w przypadku wzrostu stężenia wolnych rodników tlenowych, jonów wapnia w cytoplazmie lub uszkodzenia DNA. Działanie wymienionych czynników powoduje otwarcie mitochondrialnych kanałów jonowych nazywanych megakanałami (ang. *permeability transition pore*, PTP) umiejscowionych na styku dwóch błon mitochondrialnych. W wyniku tego procesu dochodzi do uwolnienia do cytoplazmy cytochromu c, który wiąże się z białkowym czynnikiem Apaf-1 oraz prokaspazą 9 w wyniku czego powstaje trójskładnikowa struktura nazywana apoptosomem. W skład apoptosomu wchodzi również kompleks

białek antyapoptotycznych Bcl-2/Bcl-xl do których mogą przyłączać się białka proapoptotyczne Bid, Bad, Bak, Bik. Powoduje to unieczynnienie kompleksu Bcl-2/Bcl-xl i prowadzi z kolei do aktywacji kaspazy 9 oraz kolejnych kaspaz wykonawczych (Paduch i in. 2015; Stępień i in. 2007).

Szlak mitochondrialny jest kontrolowany m.in. przez rodzinę białek Bcl-2 do których należą białka proapoptotyczne takie jak: Bid, Bad, Bak, Bax oraz białka antyapoptotyczne takie jak: Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w. Kluczowym białkiem proapoptotycznym wewnętrznego szlaku apoptozy, jest również białko p53 indukujące ekspresję genów białek: Bax, APAF-1 (ang. *apoptotic protease activating factor-1*), NOXA oraz PUMA (ang. *p53 upregulated modulator of apoptosis*). Białko p53 dzięki interakcji z kompleksem Bcl-2/Bcl-xl powoduje ich unieczynnienie oraz zwiększenie przepuszczalności błony mitochondrialnej i uwolnienie cytochromu c (Paduch i in. 2015; Stępień i in. 2007).

3. Białko p53

Białko p53 to potężny supresor będący czynnikiem transkrypcyjnym odgrywającym ważną rolę w inicjacji odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA, bodźce stresowe czy nieprawidłowe sygnały proliferacyjne. Struktura białka p53 jest złożona, a pełną aktywność zyskuje ono w wyniku prawidłowego sfałdowania tworząc tetrametry (Sznarkowska i in. 2010).

Gen *P53 (TP53)* kodujący białko p53, występuje u człowieka na chromosomie 17p13.1. Ma niewielkie rozmiary, gdyż liczy zaledwie 20 kbp. W strukturze genu występuje jedenaście eksonów, kodujących tylko 393 aminokwasy, poprzedzielanych dziesięcioma intronami. Produkt transkrypcji genu zawiera siedem domen, spełniających ściśle określone funkcje decydujące o przeżyciu lub apoptozie komórki (Sznarkowska i in. 2010; Harms i Chen 2005). Aktywne białko p53 jest więc tetramerem złożonym z czterech identycznych podjednostek zbudowanych z 393 aminokwasów. Każda podjednostka składa się z trzech domen strukturalnych: domeny N-terminalnej, rdzenia (w całości zbudowanego z domeny wiążącej DNA) i domeny C-terminalnej. Domena N-terminalna jest zbudowana z domeny transaktywacyjnej oraz rejonu bogatego w reszty proliny, złożonego z wielokrotnych powtórzeń motywu PXXP (P-prolina, X-dowolny aminokwas). Wspomniana domena jest odpowiedzialna za indukcję apoptozy jedynie poprzez oddziaływanie z innymi białkami, w tym z antyapoptotycznym białkiem Bcl-XL. Ponadto, białko p53 może przyłączać się do białek proapoptotycznych z rodziny Bcl-2 (np. Bax) indukując apoptozę (Sznarkowska i in. 2010; Harms i Chen 2005). Rejon bogaty w reszty proliny domeny N-terminalnej ma zdolność regulacji procesu apoptozy poprzez wiązanie białek mających w swojej strukturze domeny SH3 a ponadto wpływa na interakcję p53 z innymi białkami. W przypadku delecji regionu bogatego w proliny zwiększa się podatność na degradację z udziałem ubikwityny MDM2 a możliwość inicjacji apoptozy na szlaku mitochondrialnym zostaje zablokowana. (Sznarkowska i in. 2010; Hoh i in. 2002).

Koniec C-terminalny białka p53 zbudowany jest z trzech fragmentów: NLS, NES, fragmentu TET oraz fragmentu wiążącego nieswoiście DNA. Fragment NLS umożliwia dostanie się białka do wnętrza jądra a fragment NES wydostanie się białka p53 z jądra do cytoplazmy. Fragment TET jest zbudowany z łańcucha beta oraz alfa helisy, umożliwiając białku tworzenie struktury tetrameru w wyniku podwójnej dimeryzacji. Fragment wiążący nieswoiście DNA jest natomiast zbudowany z sekwencji wykazującej podwójne działanie – sekwencja wiąże się z uszkodzonym DNA promując śmierć komórki lub naprawę DNA oraz zmniejsza powinowactwo rdzenia białka do DNA (Sznarkowska i in. 2010; Vousden i Lu 2002).

Białko p53 jest więc zaangażowane w wiele procesów mających na celu utrzymanie stabilności genetycznej komórki zarówno poprzez hamowanie proliferacji komórki jak i indukcję apoptozy w celu jej eliminacji. Wewnątrzkomórkowymi procesami regulowanymi przez p53 są m.in. starzenie komórki, kontrola przechodzenia przez kolejne punkty kontrolne cyklu komórkowego – zdolność zatrzymania komórki w punktach G1/S oraz G2/M, naprawa DNA czy indukcja apoptozy. Zewnątrzkomórkowe cele działania białka p53 to hamowanie angiogenezy i indukcja szoku tlenowego (Sznarkowska i in. 2010).

3.1 Białko p53 w indukcji apoptozy

Białko p53 kontroluje główne szlaki indukcji apoptozy komórki poprzez transaktywację lub oddziaływanie z innymi białkami. Wykazano, że p53 aktywuje geny takie jak: *Bax* będące

proapoptycznym członkiem rodziny Bcl-2, *Noxa* oraz *PUMA* (Sznarkowska i in. 2010; Oda i in. 2000). Białka powstające w wyniku aktywacji wspomnianych genów oraz produkt genu *p53AIP1* wpływają na otwarcie porów obecnych w błonie wewnętrznej mitochondriów. Proces ten zaburza fosforylację oksydacyjną, powoduje spadek potencjału elektrochemicznego oraz uwolnienie z mitochondrium cytochromu c, co w ostateczności skutkuje całkowitym zaburzeniem funkcji organellum oraz aktywacji kaskady Apaf1/kaspaza 9 (Sznarkowska i in. 2010).

Kolejnymi genami ulegającymi aktywacji pod wpływem p53 jest grupa genów kodujących białka enzymatyczne kontrolujące reakcje utleniania i redukcji w komórce, tzw. geny *PIGs* (ang. p53 induced genes). Powstające reaktywne formy tlenu (ROS) uszkadzają mitochondria, indukują proces apoptotycznej śmierci komórki (Sznarkowska i in. 2010). Ponadto udowodniono, że białko p53 znacząco indukuje ekspresję błonowych receptorów śmierci FAS/APO1, DR5/KILLER, wzmacnia ekspresję genu kodującego ligand FASL oraz aktywuje białko PIDD zawierające domenę śmierci. Aktywacja wymienionych receptorów śmierci prowadzi do ich trimeryzacji oraz inicjacji kaskady kaspaz wykonawczych (Sznarkowska i in. 2010).

4. Regulacja aktywności p53 przez miRNA

W warunkach fizjologicznych białko p53 występuje w niskim stężeniu i w formie nieaktywnej. W czasie kolejnych faz cyklu komórkowego, stężenie omawianego białka jest ściśle kontrolowane. Okres półtrwania p53 w prawidłowym stanie komórki jest krótki, określany w minutach, natomiast w przypadku narażenia na czynniki uszkadzające DNA, czas biologicznego półtrwania znacząco się wydłuża przez co zwiększa się jego poziom w komórce (Sznarkowska i in. 2010).

Regulacja aktywności i poziomu p53 odbywa się za pośrednictwem wielu białek w tym: WT-1, MDM2, MDM4, PARP-1, JNK, Pirh-2. Ważną rolę w regulacji, zarówno bezpośrednio jak i pośrednio, odgrywają cząsteczki miRNA.

Pierwszymi zidentyfikowanymi cząsteczkami miRNA, bezpośrednio regulującymi aktywność białka p53 były miR-125b oraz miR-504 (Hu i in. 2010; Le i in. 2009). Cząsteczki miR-125b są negatywnymi regulatorami p53, które łącząc się z 3'UTR mRNA p53 zmniejszają ostatecznie jego ilość w komórce. Obniżenie poziomu miR-125b powoduje tym samym indukcję apoptozy w wyniku zwiększenia poziomu p53, natomiast nadekspresja miR-125b zmniejsza poziom endogennego p53 hamując programowaną śmierć komórki (Le i in. 2009). Kolejnym negatywnym regulatorem p53 jest cząsteczka miR-504, która poprzez bezpośrednie wiązanie z dwoma miejscami w regionie 3'UTR p53, tłumii jego ekspresję. Nadekspresja tego typu cząsteczki miRNA wykazuje odwrotną korelację z p53, upośledzając tym samym jego funkcje komórkowe ze szczególnym uwzględnieniem procesu apoptozy (Hu i in. 2010).

Poza bezpośrednią regulacją, białko p53 może być regulowane w sposób pośredni przez wpływ określonych miRNA na inne czynniki regulatorowe. Jedną z cząsteczek jest miR-34a, która reguluje pozytywnie omawiane białko. Udowodniono, że mi-34a oddziałuje z czynnikiem SIRT1 – ujemnym regulatorem p53 (Yamakuchi i in. 2008). SIRT1 jest zależną od dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NAD) deacetylazą regulującą proces apoptozy pod wpływem działania czynników tj.: stres oksydacyjny i genotoksyczny. SIRT1 fizycznie oddziałuje z p53 a poprzez deacetylację jego C-końcowej reszty Lys382 prowadzi do osłabienia funkcji w których pośredniczy białko p53. Zwiększona ekspresja miR-34a wpływa na obniżenie transkrypcji genu czynnika SIRT1 poprzez wiązanie miR-34a w obrębie 3'UTR SIRT1 w regionie 1414-1439 pz. Dochodzi więc do wzrostu poziomu i aktywności acetylowanego p53 indukującego m.in. programowaną śmierć komórki. Ponadto wykazano, że białko p53 indukuje transkrypcję miR34a, który następnie poprzez obniżenie ekspresji SIRT1 zwiększa aktywność białka p53. Sugeruje to istnienie dodatkowej pętli sprzężenia zwrotnego. Zatem wnioskuje się, iż zwiększona aktywność SIRT1 może zwiększać ryzyko rozwoju nowotworu a znaczna aktywność miR-34 może działać jako supresor nowotworu blokując SIRT1 oraz zwiększając aktywność białka p53 (Yamakuchi i in. 2008).

Kolejnym poznany regulatorem p53 jest miR-29. Członkowie rodziny miR-29, złożonej z miR-29a, miR-29b oraz miR-29c, wykazują zdolność zwiększania poziomu p53 wpływając tym samym na indukcję apoptozy zależną od czynnika p53. Ponadto, bezpośrednio hamują p53

(podjednostkę regulacyjną kinazy PI3) (Park i in. 2009). PI3K składa się z podjednostki regulacyjnej p110 oraz podjednostki regulacyjnej p85 α stabilizującej podjednostkę p110. PI3K jest częścią szlaku PI3K/AKT wpływającego negatywnie na aktywność białka p53 poprzez fosforylację i aktywację MDM2 przez AKT (Feng i in. 2011). MDM2 to białko będące E3 ligazą ubikwitynową kontrolującą poziom białka supresorowego p53. Kinaza AKT fosforyluje MDM2 na serynach 166 oraz 186 promując jego transport do jądra komórkowego. MDM2 wykazuje zdolność przyłączania ubikwityny do p53 powodując tym samym degradację proteolityczną tego białka supresorowego. Członkowie rodziny miR-29 celując w p85 α zmniejszają aktywność szlaku PI3K/AKT co wpływa na zmniejszenie fosforylacji AKT i MDM2 a tym samym prowadzi do aktywacji p53 oraz indukcji apoptozy. Obecnie wiadomo, że obniżenie poziomu miR-29 obserwuje się w raku piersi, płuc oraz w białaczce (Feng i in. 2011).

Zwiększenie poziomu oraz aktywności p53 jest również możliwe dzięki cząsteczce miR-122, która ujemnie reguluje cyklinę G1 – białko uczestniczące w regulacji proliferacji komórek (Fornari i in. 2009). MiR-122 jest cząsteczką specyficzną dla wątroby, stanowiącą 70% całkowitej populacji miRNA, której obniżenie jest cechą charakterystyczną raka wątrobowokomórkowego (HCC ang. *hepatocellular carcinoma*). Cyklina G1 tworzy kompleks z fosfatazą PP2A i usuwa resztę fosforanową z MDM2 zwiększając jego aktywność a tym samym hamując aktywność p53. Ponadto wykazano, że cyklina A/CDK2 powoduje fosforylację MDM2 hamując jego aktywność a stymulując p53. Poprzez bezpośrednie tłumienie cykliny G1 przez miR-122 zwiększa się poziom i aktywność białka p53 (Feng i in. 2011).

5. Podsumowanie

Białko supresorowe p53, nazywane strażnikiem genomu, odgrywa kluczową rolę w regulacji cyklu komórkowego. Działając jako czynnik transkrypcyjny wpływa na aktywność wielu genów docelowych w celu zainicjowania różnych odpowiedzi komórkowych. Sam gen p53 podlega jednak ścisłej kontroli przez liczne czynniki w tym miRNA, będące krótkimi, niekodującymi cząsteczkami RNA regulującymi ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. Ostatnie badania wykazują że p53 nie tylko samo reguluje cząsteczki miRNA ale ulega hamowaniu lub indukcji przez miRNA takie jak: miR125b, miR504, miR-34a, miR29 oraz miR122. Poprzez wspomnianą regulację p53 oraz cząsteczki miRNA istotnie wpływają na proces apoptozy a tym samym na proces indukcji lub hamowania nowotworzenia co może stanowić podstawę do tworzenia ukierunkowanych schematów terapeutycznych.

6. Bibliografia

- Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, et al. (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, 447(7146): 823-828.
- Feng Z, Zhang C, Wu R, Hu W (2011) Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *Journal of molecular cell biology* 3(1): 44-50.
- Filip A (2007) MikroRNA: nowe mechanizmy regulacji ekspresji genów. *Postępy Biochemii* 53(4):413-419.
- Filip A (2006) Mikro-RNA - małe cząsteczki o wielkim znaczeniu. *Postępy Biologii Komórki* 33(1): 45-57.
- Fornari F, Gramantieri L, Giovannini C, et al. (2009) MiR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Research* 69(14): 5761–5767.
- Harms KL, Chen X (2005) The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant. *Molecular and Cellular Biology* 25(5): 2014–2030.
- Hoh J, Jin S, Parrado T, et al. (2002) The p53 MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(13): 8467–8472.
- Hu W, Chan CS, Wu R, et al. (2010) Negative regulation of tumor suppressor p53 by microRNA miR-504. *Molecular Cell* 38(5): 689–699.

- Hukowska-Szematowicz B, Deptuła W (2010) Biologiczna rola mikroRNA (miRNA). Nowe dane. *Postępy Biologii Komórki* 37(3): 585-597.
- Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, et al. (2009). MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes and Development* 23(7): 862–876.
- Li SC, Tang P, Lin WC (2007) Intronic microRNA: discovery and biological implications. *DNA and Cell Biology* 26(4): 195-207.
- Paduch R, Klatka M, Klatka J (2015) Rodzaje śmierci komórki. *Pomeranian Journal of Life Sciences* 61(4): 411–418.
- Park SY, Lee JH, Ha M, et al. (2009) MiR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nature Structural and Molecular Biology* 16(1): 23–29.
- Oda E, Ohki R, Murasawa H, et al. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288(5468): 1053–1058.
- Ouellet DL, Perron MP, Gobeil LA, et al. (2006) MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006: 1-20.
- Stępień A, Izdebska M, Grzanka A (2007) Rodzaje śmierci komórki. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 61:420-428.
- Sznarkowska A, Olszewski R, Zawacka-Pankau J (2010) Farmakologiczna aktywacja supresora nowotworu, natywnego białka p53 jako obiecująca strategia zwalczania nowotworów. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (online) 64: 396-407.
- Vousden KH, Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer* 2(8): 594–604.
- Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ (2008) MiR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(36): 13421–13426.
- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA (2007) MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology* 302(1): 1-12.

11. Rola miR-15a/ miR-16 w patogenezie szpiczaka plazmocytoowego

The role of miR-15a / miR-16 in the pathogenesis of multiple myeloma

Miśkiewicz Joanna⁽¹⁾, Krawczyk Agata⁽²⁾, Strzałka-Mrozik Barbara⁽¹⁾

⁽¹⁾ Zakład Biologii Molekularnej Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾ Zakład Nutrigenomiki i Bromatologii Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Barbara Strzałka-Mrozik

Miśkiewicz Joanna: joanna.miskiewicz@med.sum.edu.pl

Słowa kluczowe: szpiczak mnogi, mikroRNA, apoptoza, komórki plazmatyczne

Streszczenie

MikroRNA (miRNA) to grupa małych, niekodujących cząsteczek o długości 21-23 nukleotydów, wykazujących zdolność regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. Uznaje się, iż biorą one udział w wielu ważnych procesach komórkowych takich jak: różnicowanie komórek macierzystych układu krwiotwórczego, embriogeneza, apoptoza, stany zapalne, infekcje bakteryjne lub wirusowe, choroby sercowo-naczyniowe oraz nowotwory. Wiele badań wskazuje na możliwość wykorzystania cząsteczek mikroRNA w prognosyce chorób nowotworowych, na podstawie analizy profilu ekspresji genów. Wykazano znaczące zmiany w profilu ekspresji miRNA m.in. w szpiczaku plazmocytoowym (szpiczaku mnogim), będącym chorobą nowotworową charakteryzującą się niekontrolowaną proliferacją komórek plazmatycznych wydzielających nieprawidłowe białka monoklonalne. Jest to schorzenie o nie do końca poznanej etiopatogenezie. Sugeruje się jednak, że główną rolę odgrywają zaburzenia molekularne w zmienionych nowotworowo komórkach plazmatycznych. Udowodniono istotną zależność między obniżeniem ekspresji miR-15a/miR-16 a progresją choroby. MiR-15a oraz miR-16 wykazują rolę supresora nowotworowego, wpływającego na proliferację i wzrost komórek poprzez: hamowanie kinazy AKT3, białka rybosomalnego S6, NF-κB, kinazy MAPK oraz na regulację ekspresji genów kodujących takie białka jak: BCL2, MCL1, CCDN1, VEGF oraz WNT3A. Ponadto, wskazane miRNA pośrednio wpływają na zmniejszenie neoangiogenezy szpiku kostnego oraz obniżenie interakcji między komórkami nowotworowymi a środowiskiem szpiku. Wnioski z przeprowadzonych dotychczas badań stanowią podstawę do opracowania nowych celowanych metod terapeutycznych.

1. Szpiczak plazmocytoowy

Szpiczak plazmocytoowy (ang. *plasma cell myeloma*, PCM) nazywany również szpiczakiem mnogim (ang. *multiple myeloma*, MM) jest nowotworem o charakterystycznym monoklonalnym rozroście atypowych komórek plazmatycznych. Choroba charakteryzuje się wieloetapowym rozwojem. Pierwszym stadium schorzenia jest gammapatia monoklonalna o nieokreślonym znaczeniu (ang. *monoclonal gammopathy of undetermined significance*, MGUS) po czym dochodzi do progresji do objawowego PCM. U części chorych może dojść do rozwoju dodatkowego, bezobjawowego etapu pośredniego nazywanego szpiczakiem tłym (ang. *smoldering multiple myeloma*). Pomimo sukcesywnego rozwoju metod badawczych etiopatogeneza szpiczaka plazmocytoowego nie została do końca poznana. Wprowadzenie metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. *fluorescence in situ hybridization*, FISH) pozwoliło na analizę atypowych plazmocytoów oraz potwierdzenie obecności zaburzeń chromosomalnych. Ponadto, dzięki zastosowaniu molekularnych technik mikromacierzy DNA/RNA i metod sekwencjonowania następnej generacji (ang. *next generation sequencing*, NGS) uzyskano informacje dotyczące mechanizmów patogenetycznych i architektury wewnątrzklonalnej PCM (Iskierka-Jażdżewska i Jamroziak 2015). Pomimo niekompletnej wiedzy dotyczącej etiologii PCM wskazuje się na istotną zależność czynników środowiskowych i predyspozycji genetycznych.

W etiopatogenezie PCM znaczącą rolę odgrywają czynniki środowiskowe, w tym przebycie chorób ze szczególną aktywacją układu immunologicznego. Zwraca się uwagę na przebyte choroby autoimmunizacyjne, np. niedokrwiłość Addisona-Biermera, przewlekłe choroby zapalne – np. kłębuszkowe zapalenie nerek, infekcje wirusowe czy bakteryjne – np. zakażenie ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV), zapalenie płuc, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Wśród czynników środowiskowych wymienia się również dietę ubogą w warzywa i otyłość a wśród nie potwierdzonych ekspozycję na czynniki szkodliwe, czynniki kancerogenne, spożywanie alkoholu, tytoniu oraz narażenie na radiację (Iskierka-Jażdżewska i Jamroziak 2015).

Szpiczak plazmocytowy rozwija się na skutek nasilonej proliferacji patologicznych plazmacytów. Nieprawidłowości cytogenetyczne opierają się najczęściej na zaburzonym *locus* łańcucha ciężkiego immunoglobuliny (Ig), delecji chromosomu 13, translokacji t(4;14) związanej z fuzją receptora wzrostu fibroblastów 3 (FGFR3) i domeny MM SET oraz delecji 17p. Czynnikiem znacząco wpływającym na rozwój PCM jest interakcja pomiędzy komórkami szpiczaka oraz mikrośrodowiskiem szpiku kostnego zależna od niektórych cytokin tj.: interleukiny 6 (IL-6), insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1) oraz czynnika wzrostu heptatocytów (HGF). Cytokiny te wpływają na indukcję sygnalizacji kaskad RAF/MAPK oraz JAK/STAT poprzez jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (ang. *Nuclear Factor kappa B*, NF-κB) sprzyjające proliferacji oraz przeżyciu komórek szpiczaka, a także zahamowaniu procesu programowanej śmierci komórki, czyli apoptozy. Innymi zaburzeniami molekularnymi w szpiczaku jest deregulacja procesów epigenetycznych, w tym zmiana ekspresji mikroRNA (Iskierka-Jażdżewska i Jamroziak 2015).

2. Biogeneza mikroRNA

RNA jest uważany za jeden z głównych czynników mogących regulować proces ekspresji innych genów. Wyróżnia się kilka rodzajów krótkich, regulatorowych RNA określanymi jako srRNA (ang. *small regulatory RNA*): miRNA (ang. *mikroRNA*) wykazujące zdolność potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów oraz krótkie interferujące RNA- siRNA(ang. *small interfering RNA*) wyciszające geny na etapie transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym (Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010).

MiRNA to małe, niekodujące cząsteczki RNA o długości 21-23 nukleotydów. Geny dla cząsteczek miRNA mogą występować w obszarach międzygenowych oraz w intronach i/lub egzonach genów strukturalnych. Ponadto, mogą tworzyć policistronowe skupiska lub występować pojedynczo. Organizacja genów cząsteczek miRNA jest charakterystyczna dla działania polimerazy II oraz III, jednak większość genów dla miRNA ulega transkrypcji przez polimerazę II. W pierwszym etapie powstawania miRNA, dochodzi do utworzenia pierwotnego transkryptu pri-miRNA (ang. *primary miRNA*), przyjmującego początkowo strukturę „spinki do włosów” złożonej z pętli i dwuniciowego trzonu (Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010; Filip 2007; Grenda i in. 2013; Ouellet i in. 2006). Dojrzewanie pri-miRNA odbywa się z udziałem enzymów: Drosha oraz Dicer. Enzym Drosha działa bezpośrednio w jądrze komórkowym, gdzie umożliwia wstępną obróbkę pri-miRNA prowadząc do powstania cząsteczki pre-miRNA, która w połączeniu z jądrowym białkiem transportującym- eksportyną 5, przechodzi do cytoplazmy i podlega dalszej obróbce. Enzym Dicer wraz z białkami Agronaut (AGO) oraz TRBP (ang. *transactivating response RNA-binding protein*), bierze udział w powstawaniu dojrzałej cząsteczki miRNA. Dicer rozpoznaje dwuniciowy pre-miRNA i rozcina go u podstawy pętli w wyniku czego powstają dwuniciowe RNA o długości 22 nukleotydów. W kolejnym etapie, cząsteczka po modyfikacji przez enzym Dicer, pozostaje w kompleksie RISC (ang. *RNA induced silencing complex*) – kompleksie rybonukleoproteinowym biorącym udział w wyciszaniu ekspresji genów, rozpoznającym nic przewodnią dupleksu RNA. Aktywną postacią miRNA jest więc cząsteczka srRNA wbudowana w kompleks RISC. Dzięki białkom Ago wbudowanym we wspomniany kompleks możliwa jest degradacja docelowego mRNA lub hamowanie translacji (Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010; Ouellet i in. 2006).

Mechanizm działania cząsteczek miRNA opiera się na potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów, możliwej dzięki komplementarności par zasad z mRNA. Wyciszenie genów opiera się na degradacji mRNA lub na hamowaniu translacji określonego transkryptu. MiRNA ulegają

przyłączeniu do 3'UTR docelowego mRNA. W przypadku całkowitej komplementarności między cząsteczką miRNA a mRNA, białko Ago2 może prowadzić do degradacji informacyjnego RNA. Do rozszczepienia dochodzi między nukleotydami 10 i 11 powstałego dupleksu. Sam miRNA nie ulega zużyciu w omówionym procesie, stąd wynika że może uczestniczyć w rozszczepianiu kolejnych cząsteczek mRNA. W przypadku niepełnej komplementarności między miRNA a mRNA, białko Ago2 jedynie rozszczepia cząsteczkę mRNA przy zachowaniu odpowiedniego układu i rozmieszczenia miejsc komplementarnych, prowadząc do wyciszenia na zasadzie blokowania translacji (Grenda i in. 2013; 6., Hutvágner i Zamore 2002; John i in. 2004).

Obecnie wiadomo, że cząsteczki miRNA regulują ponad 30% genów ludzkiego genomu, uczestnicząc w prawidłowym rozwoju komórek. Ponadto, są cząsteczkami wielofunkcyjnymi, odgrywającymi ogromną rolę zarówno w procesach fizjologicznych jak i patologicznych takich jak: różnicowanie komórek macierzystych układu krwiotwórczego, erytropoeza, megakariocytopoeza, embriogeneza, różnicowanie komórek mięśni szkieletowych, angiogeneza, neurogeneza, apoptoza, odporność, stany zapalne, choroby sercowo-naczyniowe oraz nowotwory (Hukowska-Szematowicz i Deptuła 2010; Alvarez-Garcia i Miska 2005). Obecnie wiadomo, że w wielu schorzeniach profil ekspresji genów kodujących określone miRNA znacząco różni się w porównaniu z ich fizjologicznym poziomem. Wykazano również, że w przypadku szpiczaka plazmocytoowego dochodzi do znaczącej zmiany poziomu ekspresji genów kodujących różne miRNA w tym miR15a oraz miR-16 (Roccaro i in. 2009).

3. MiR-15a/MiR16-1 w patogenezie szpiczaka plazmocytoowego

Zarówno miR-15a jak i miR16-1 wykazują podobne funkcje supresora nowotworów. Są zaangażowane w takie procesy jak: różnicowanie komórek, proliferacja, apoptoza lub angiogeneza. MiR-15a i miR16-1 występują w *loci* 13q14.3 będącym regionem ulegającym delecji u 50% przypadków chorych na szpiczaka plazmocytoowego co może wskazywać na związek z patogenezą choroby. Badania przeprowadzone przez Roccaro i wsp. wskazują na znacząco obniżoną ekspresję miR-15a oraz miR-16 w klonalnych komórkach plazmatycznych pacjentów z PCM w porównaniu z komórkami pozyskanymi od osób zdrowych oraz na całkowity brak omawianych cząsteczek miRNA u pacjentów z delecją 13q14 (Roccaro i in. 2009). W wielu badaniach wykazano znaczne obniżenie ekspresji genu miR-15a oraz miR16 u pacjentów z nowo zdiagnozowanym szpiczakiem mnogim w porównaniu z osobami zdrowymi (Li i in. 2015). W badaniach Li i wsp. (Li i in. 2015) wykazali ponadto, że pomimo tego iż zarówno miR-15a jak i miR-16-1 znajdują się w tym samym *loci* (13q14), ich wzory ekspresji wykazywały znaczne różnice. U nowo zdiagnozowanych pacjentów, miR-15a wykazywał znaczne zróżnicowanie poziomów ekspresji w porównaniu do ekspresji miR-16-1. Ponadto, poziom ekspresji miR-15a był znacznie obniżony u nowo zdiagnozowanych pacjentów oraz u pacjentów ze wznową choroby. Zauważono natomiast, iż poziom ekspresji miR-15a u pacjentów w fazie remisji koreluje z poziomem ekspresji u osób zdrowych. Przeciwnie, pomimo obniżenia poziomu ekspresji miR-16-1 u pacjentów nowo zdiagnozowanych oraz z nawrotem choroby, nie zauważono przywrócenia prawidłowego poziomu ekspresji u pacjentów w fazie remisji. Dane przedstawione przez Li i wsp. wskazują iż pacjenci z obniżonym poziomem ekspresji miR-15a (<2,35) mieli znacznie skrócony czas przeżycia wolnego od progresji (ang. *progression-free survival*, PFS) oraz czas całkowitego przeżycia (ang. *overall survival*, OS) w porównaniu z pacjentami z wysokim poziomem ekspresji (≥2,35) (Li i in. 2015). Wnioskuje się więc, iż miR-15a jest związany z postępem choroby oraz złym rokowaniem, natomiast miR-16-1 może być cennym markerem diagnostycznym (Li i in. 2015).

Udowodniono, że miR-15a oraz miR-16 regulują proliferację i wzrost komórek poprzez hamowanie serynowo/treoninowej kinazy białkowej (AKT3), białka rybosomalnego S6, kinazy MAP, oraz aktywatora NF-κB TAB3. Wykazano również znaczący wpływ miR-15a i miR-16 na aktywność ścieżki NF-κB, której aktywacja odgrywa kluczową rolę w promowaniu wzrostu i przeżyciu komórek. Wiadomo, że aktywacja szlaku NF-κB zachodzi w wyniku działania kompleksu składającego się z TAK1 oraz białek TAB1, TAB2 lub TAB3. Roccaro i wsp. (Roccaro i in. 2009) wykazali, że miR-15a oraz miR-16 celują w białko TAB3 poprzez jego hamowanie. Jednakże, w wyniku obniżenia ekspresji genów kodujących miR-15a oraz miR16, antyapoptotyczny czynnik

NFκB nie ulega hamowaniu, stąd proces apoptozy zostaje zahamowany. Ponadto, zwrócono szczególną uwagę na kluczową rolę komórek śródbłonna i angiogenezę w patogenezie i progresji szpiczaka mnogiego. Wiadomo, że komórki szpiczakowe wydzielają jedno z głównych białek o działaniu proangiogennym – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF). Konsekwencją indukcji wzrostu komórek śródbłonna przez komórki szpiczakowe jest zwiększona angiogeneza szpiku kostnego, która promuje progresję PCM a tym samym zwiększa oporność na terapię. Roccaro i wsp. wykazali, że miR-15a oraz miR-16 hamują wydzielanie VEGF z komórek, zmniejszając tym samym aktywność proangiogenną w komórki śródbłonna. Obniżona ekspresja omawianych cząsteczek miRNA może wpływać na progresję szpiczaka plazmocytozy (Roccaro i in. 2009). Badania wspomnianych autorów potwierdzają również znaczący wpływ serynowo/treoninowej kinazy białkowej (AKT3), białka rybosomalnego S6 oraz kinazy MAP na progresję szpiczaka. Autorzy wykazali, że komórki transfekowane pre-miRNA-15a oraz pre-miRNA-16-1 hamują AKT3, pAKT, pS6R oraz pERK (Roccaro i in. 2009)

Dowiedziano także, iż ekspresja miR-15a oraz miR-16 jest odwrotnie skorelowana z ekspresją genu kodującego antyapoptotyczne białko Bcl-2. Wiadomo, że sekwencja mRNA BCL2 oraz sekwencje miR-15a oraz miR-16-1 są komplementarne, co sugeruje możliwość procesu represji potranskrypcyjnej. Podobnie jak w przypadku braku hamowania aktywności NF-κB, obniżenie ekspresji miR-15a oraz miR-16 wpływa na znaczący wzrost ekspresji genu białka Bcl-2 a tym samym hamowanie procesu apoptozy indukując wzrost przeżywalności komórek szpiczaka (Roccaro i in. 2009; Aqeilan i in. 2010; Cimmino i in. 2005).

Jedne z najnowszych badań przeprowadzone przez Zhang i wsp. (Zhang i in. 2018) dostarczają kolejnych informacji dotyczących skutków obniżenia ekspresji genu kodującego cząsteczkę miR-15a oraz miR-16 w progresji szpiczaka mnogiego. W badaniu zidentyfikowano potencjalne miejsca docelowe miR-15a/miR-16 w sekwencji mRNA białka wiążącego kalcyneurynę 1 (ang. *calcineurin binding protein 1*, CABIN1) wykazujące zdolność oddziaływania z białkiem p53 tłumiąc jego aktywność transkrypcyjną. Białko p53 jest kluczowym czynnikiem mitochondrialnego szlaku apoptozy, hamującym podziały umożliwiając naprawę materiału genetycznego, stąd nazywane jest również strażnikiem genomu. W chwili braku naprawy uszkodzeń genomu, p53 uruchamia śmierć apoptotyczną komórki. Wykazuje zdolność tworzenia kompleksu z antyapoptotycznymi białkami Bcl-2/Bcl-xl, unieczynniając je oraz zwiększając przepuszczalność błony mitochondrialnej i uwalniając do cytoplazmy cytochrom c (Paduch i in. 2015). Kalcyneuryna jest białkiem enzymatycznym o aktywności fosfatazy serynowo-treoninowej, wykazującym zdolność wiązania wraz z kalmodulem, jonów wapnia uwalnianych z retikulum endoplazmatycznego przez trifosforan inozytolu (IP3). W kolejnym etapie dochodzi do utworzenia kompleksu kalcyneuryna/kalmodulina/Ca²⁺. CABIN1 został uznany jako ujemny regulator p53, który utrzymuje go w stanie nieaktywnym. Wykazano, że w wyniku wzrostu poziomu miR-15a oraz miR-16 dochodzi do negatywnej regulacji ekspresji CABIN1 oraz do zahamowania wzrostu komórek. Tym samym postawiono hipotezę, że miR-15a oraz miR-16 mogą, za pośrednictwem CABIN1, wpływać na przeżycie komórek szpiczaka. Zhang i wsp., podobnie jak inni badacze wykazali, iż ekspresja miR-15a i miR-16 jest całkowicie zniesiona lub zmniejszona w komórkach pozyskanych od pacjentów chorych na szpiczaka w porównaniu z osobami zdrowymi. Równocześnie wykazano, iż poziom mRNA CABIN1 był ujemnie skorelowany z poziomami miR-15a oraz miR-16 (Zhang i in. 2018).

4. MiR-15a/miR-16 jako cele terapeutyczne w szpiczaku mnogim

Odpowiedź na zastosowaną terapię, u pacjentów chorych na szpiczaka mnogiego, bywa znacząco zróżnicowana, co stwarza szereg trudności związanych z leczeniem klinicznym. Oporność na leki chemioterapeutyczne, wymusza konieczność poszukiwania nowych celowanych środków terapeutycznych oraz wskaźników prognostycznych do monitorowania odpowiedzi na leczenie. Cząsteczki miRNA wykazują możliwość regulacji docelowych genów poprzez tłumienie ich ekspresji. Jak wykazują omówione badania, zarówno miRNA jak i geny docelowe regulują różnorodne funkcje komórek i stanowią cenne strategie terapeutyczne. Li i wsp. wykazali, że miR-15a jest związany ze znacznym postępem choroby oraz złym rokowaniem, natomiast miR-16-1 może być dobrym markerem diagnostycznym szpiczaka mnogiego (Li i in. 2015). Oporność na apoptozę

w komórkach szpiczaka mnogiego wynika często z nadekspresji białka Bcl-2, promując przeżycie tych komórek a cząsteczki miR-15a/miR-16 wykazują zdolność represji potranskrypcyjnej Bcl-2. Ponadto, omawiane cząsteczki miRNA wpływają na kaskady sygnalizacyjne regulujące proliferację komórek szpiczaka, w tym wpływają hamująco na takie czynniki jak: AKT3, pAKT, pS6R oraz pERK (Roccaro i in. 2009). Wszystkie te funkcje miR-15a/miR-16, umożliwiają obiecującą strategię rozwoju ukierunkowanych środków terapeutycznych. Uzasadnione jest więc wprowadzenie syntetycznie zmodyfikowanych miRNA do komórek nowotworowych lub hamowanie endogennych cząsteczek miRNA. Celem takiej terapii staje się więc reaktywacja szlaków regulowanych przez miRNA, co może prowadzić do blokowania niekontrolowanej proliferacji i indukcji kaskady apoptotycznej (Ahmad i in. 2014).

5. Podsumowanie

MikroRNA (miRNA) są głównymi regulatorami ludzkiego genomu, regulującymi zarówno fizjologiczne jak i patologiczne szlaki komórkowe. Znacząca deregulacja określonych miRNA może promować powstawanie oraz progresję wielu chorób nowotworowych, w tym szpiczaka plazmatycznego. Wiele badań jednoznacznie wskazuje na istotną rolę miR-15a oraz miR-16-1 w patogenezie szpiczaka, udowadniając ich znacząco obniżoną ekspresję w komórkach plazmatycznych. Jednoznacznie wskazuje się, iż w wyniku transdukcji wspomnianych cząsteczek miRNA do komórek, dochodzi do regulacji proliferacji i wzrostu a także przywrócenia prawidłowej funkcji procesu apoptozy. Ponadto miR-15a/ miR-16 pośrednio wpływa na zmniejszenie neoangiogenezy szpiku kostnego oraz obniżenie interakcji między komórkami nowotworowymi a środowiskiem szpiku. Przeprowadzone dotychczas badania stanowią więc podstawę do opracowywania nowych celowanych terapii ukierunkowanych na cząsteczki mikroRNA.

6. Bibliografia

- Ahmad N, Haider S, Jagannathan S et al. (2014) MicroRNA theragnostics for the clinical management of multiple myeloma. *Leukemia* 28(4): 732-738.
- Alvarez-Garcia I, Miska EA (2005) MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 132(21): 4653-4662.
- Aqeilan R, Calin GA, Croce CM (2010) MiR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death&Differentiation* 17: 215-220.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M et al. (2005) MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(39): 13944-13949.
- Filip A (2007) MikroRNA: nowe mechanizmy regulacji ekspresji genów. *Postępy biochemii* 53(4): 413-419.
- Grenda A, Budzyński M, Filip AA (2013) Biogeneza cząsteczek mikroRNA oraz ich znaczenie w powstawaniu i przebiegu wybranych zaburzeń hematologicznych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 67:174-185.
- Hukowska-Szematowicz B, Deptuła W (2010) Biologiczna rola mikroRNA (miRNA) nowe dane. *Postępy Biologii Komórki* 37(3): 585-597.
- Hutvágner G, Zamore PD (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, 297(5589): 2056-2060.
- Iskierka-Jażdzewska E, Jamroziak K. (2015) Etiologia i patogeneza szpiczaka plazmatycznego. *Hematologia*,6(3): 245–263.
- John B, Enright AJ, Aravin A et al. (2004) Human microRNA targets. *PLOS Biology* 2(11): e363.
- Li F, Xu Y, Deng S (2015) MicroRNA-15a/16-1 cluster located at chromosome 13q14 is down-regulated but displays different expression pattern and prognostic significance in multiple myeloma. *Oncotarget* 6(35): 38270-38282.
- Ouellet DL, Perron MP, Gobeli LA et al. (2006) MicroRNAs in gene regulation: when the smallest governs it all. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (online) 2006:1-20. Article ID: 69616.

- Paduch R, Klatka M, Klatka J (2015) Rodzaje śmierci komórki. *Pomeranian Journal of Life Science* 61(4): 411-418.
- Roccaro AM, Sacco A, Thompson B et al. (2009) MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood* 113(26):6669-6680.
- Zhang L, Zhou L, Shi M et al. (2018) Downregulation of miRNA-15a and miRNA-16 promote tumor proliferation in multiple myeloma by increasing CABIN1 expression. *Oncology Letters* 15(1):1287-1296.

12. Selektywny niedobór IgA

Selective IgA deficiency

Morawska Izabela⁽¹⁾, Mertowski Sebastian⁽²⁾, Gosik Krzysztof⁽²⁾

⁽¹⁾ Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾ Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Opiekun naukowy: prof. dr hab. n. med. Jacek Roliński, dr hab. n. med. Ewelina Grywalska

Izabela Morawska: izabelamorawska19@gmail.com

Słowa kluczowe: PNO, niedobór odporności, astma, alergia, choroby autoimmunologiczne

Streszczenie

Selektywny niedobór IgA jest najczęściej występującym wrodzonym niedoborem odporności. W zależności od populacji częstość jego występowania szacuje się na 1:350-1:700 osób. Definiuje się go jako spadek poziomu immunoglobuliny A poniżej 0,07g/l u dzieci po ukończeniu 4 roku życia przy prawidłowym poziomie IgM i IgG. Warto pamiętać, że obniżenie poziomu IgA jest naturalnym elementem dojrzewania układu odpornościowego a ustalanie toru syntezy tej immunoglobuliny zakończyć się może około 12 roku życia. Zwykle schorzenie pozostaje niezdiagnozowane przez całe życie pacjenta, w związku z częstym bezobjawowym przebiegiem. U pacjentów, którzy demonstrują objawy tego schorzenia, mogą występować częstsze, ale niezagrażające życiu zakażenia dróg oddechowych, przewodu pokarmowego oraz dróg moczowych. Sugeruje się także częstsze występowanie chorób z autoagresji i alergicznych takich jak: celiakia, astma oskrzelowa, alergia, choroba Hashimoto, w tej grupie pacjentów. Z niedoborem IgA może współistnieć niedobór podklas IgG2/4 oraz zaburzenia syntezy swoistych przeciwciał. Istnieją doniesienia o możliwości transformacji SIgAD w pospolity zmienny niedobór odporności (CVID) o znacznie cięższym przebiegu, rokowaniu i odmiennym leczeniu.

1. Wstęp

Pierwotne niedobory odporności (PNO) stanowią heterogenną grupę chorób o podłożu genetycznym i odmiennym sposobie dziedziczenia (z chromosomem X, autosomalnie recesywnie, wielogenowo) u których podłoża leży osłabienie lub utrata przynajmniej jednej z funkcji układu immunologicznego. Mimo znacznych różnic cechą wspólną PNO jest osłabienie mechanizmów obronnych organizmu i w konsekwencji zwiększenie częstotliwości zakażeń, wzrost ryzyka autoagresji oraz częstotliwości występowania chorób rozrostowych. (Kumar et al. 2006) Patologie w tych schorzeniach mogą dotyczyć różnych elementów układu odpornościowego, stąd umownie możemy je podzielić na zaburzenia w obrębie odporności humoralnej (około 50%), komórkowej, funkcji fagocytów oraz układu dopełniacza. Niektóre z PNO, w szczególności ciężki złożony niedobór odporności (SCID), mogą prowadzić do śmierci pacjenta we wczesnym dzieciństwie a jedyną szansą na przeżycie jest transplantacja komórek hematopoetycznych lub niedostępna w naszym kraju, terapia genowa. Zaburzenia liczności i/lub funkcji przeciwciał (agammaglobulinemia Brutona, CVID), stanowiące znaczną większość rozpoznawanych PNO, mimo swojej bogatej symptomatologii mogą być skutecznie leczone preparatami immunoglobuliny ludzkiej, w tym preparatami podskórnymi podawanymi samodzielnie przez pacjenta w domu. (Gołąb i in. 2002) Szczególnym schorzeniem w grupie niedoborów przeciwciał jest selektywny niedobór IgA, bowiem zwykle przebiega bezobjawowo a jego częstość w naszej populacji określa się pomiędzy 1:350 a 1:700 osób. (Hammarstrom et al. 2000). Celem pracy jest podsumowanie aktualnie dostępnej wiedzy dotyczącej selektywnego niedoboru IgA, jego symptomatologii, powikłań, procesu diagnostycznego oraz leczenia i postępowania terapeutycznego.

2. Opis zagadnienia

Immunoglobuliny to heterogenna grupa protein, niezbędnych dla funkcjonowania układu odpornościowego. Mimo wielu różnic, cechą charakterystyczną wszystkich immunoglobulin jest swoisty schemat budowy – dwa łańcuchy lekkie i dwa łańcuchy ciężkie połączone mostkami disiarczkowymi. Wyróżniamy część stałą tzw. region Fc oraz część zmienną, czyli region Fab. Funkcją regionu Fab jest rozpoznawanie i wiązanie epitopów. W związku z charakterystyczną budową łańcucha ciężkiego, możemy podzielić immunoglobuliny na klasy – IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. Swoistość względem określonych antygenów wynika z pewnych różnic strukturalnych obserwowanych w obrębie części zmiennych, natomiast za różnice w funkcjach efektorowych odpowiadają części stałe Ig (Gołąb i in. 2002).

IgA są klasą immunoglobulin, dla której charakterystyczna jest obecność łańcucha ciężkiego alfa. We krwi ludzkiej IgA występuje w postaci monomerycznej (80-95%), natomiast wydzielnicza IgA znajdująca się na powierzchni błon śluzowych występuje zwykle w postaci dimerów, zdecydowanie rzadziej trimerów i tetramerów. W organizmie ludzkim wyróżniamy dwie podklasy tej immunoglobuliny: IgA1, głównie monomeryczną, dominującą w osoczu, o wydłużonym regionie zawiasowym oraz IgA2, głównie występującą w postaci dimerów, dominującą w obrębie przewodu pokarmowego z charakterystycznym, skróconym do 7 aminokwasów regionem zawiasowym. (Gołąb i in. 2002). Do powstania sekrecyjnej IgA wymagane jest współdziałanie plazmacytów oraz pIgR czyli specyficznego receptora dla fragmentu Fc (receptora dla polimerycznych form immunoglobulin). Dimeryczne przeciwciała, połączone kowalencyjnie łańcuchem łączącym J, na powierzchnię błon śluzowych wydzielane są z charakterystycznym dla nich fragmentem wydzielniczym S.C. Zarówno SC jak i pIgR biorą udział w transcytozie, czyli specyficznym procesie transportu IgA, z podstawnej i bocznej powierzchni komórek nabłonkowych. (Kaetzel et al. 1991). Dobowa synteza immunoglobuliny A przekracza sumaryczną produkcję wszystkich innych immunoglobulin, estymuje się, że wyłącznie w błonie śluzowej przewodu pokarmowego produkowane jest 3-6g/dobę tego białka. Osoczowe stężenie IgA jest bardzo niskie, niejasna jest także jego rola. (Czyżewska-Buczyńska i in. 2007).

Sekrecyjna IgA (sIgA) dominuje w obrębie błon śluzowych oraz wydzielin śluzowo-surowiczych: siarce, ślinie, łzach. Ze względu na tak liczną reprezentację w obrębie błon śluzowych uznaje się, że sIgA stanowi pierwszą linię obrony organizmu przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi. (Fagarasan et al. 2003). Istotnym aspektem są funkcje tej klasy immunoglobulin. Udowodniono, że sIgA ma zdolność do adsorpcji antygenów pokarmowych, aglutynacji bakterii oraz hamowania ich adhezji do powierzchni błon śluzowych. Doniesienia wskazują na zdolność neutralizacji i hamowania uwalniania cząsteczek wirusów, neutralizacji toksyn i enzymów produkowanych przez liczne patogeny. Opłaszczając alergeny blokuje ich łączenie się z immunoglobulinami E i rozwój reakcji alergicznej. Co więcej, wykazano, że dimeryczna forma tej immunoglobuliny pełni funkcję antyzapalną dzięki neutralizacji LPS (lipopolisacharydu), który mediuje ostrą reakcję zapalną przez translokację czynnika NF-kB. (Fernandez et al. 2003). Badacze wskazują na pomocniczą funkcję sIgA w tworzeniu mikrobioty przewodu pokarmowego dzięki ułatwianiu niektórym gatunkom bakterii np. *Bacterioides fragilis* kolonizacji śluzu. (Donaldson et al. 2018). Niskie stężenie IgA w surowicy jest także wynikiem krótkiego okresu półtrwania (4-7 dni) oraz wynika z faktu, że na jego poziom wpływ mają leki używane często w praktyce klinicznej – NLPZ, inhibitory konwertazy angiotensyny, niektóre leki przeciwpadaczkowe czy stosowane w reumatologii leki modyfikujące przebieg choroby. Stosowane leki mogą wywołać jatrogenny izolowany SIgAD. (Gołąb i in. 2002)

Proces dojrzewania układu odpornościowego rozpoczyna się już w okresie płodowym. Wczesne IgG i IgM syntetyzowane są w wątrobie dziesięcioletniego płodu, osiągając maksymalny poziom do dwudziestego tygodnia. Stężenie IgG narasta szczególnie na przełomie drugiego i trzeciego trymestru ciąży a najwyższy poziom osiąga w chwili narodzin, przy czym większość przeciwciał jest pochodzenia matczynego. (Czyżewska-Buczyńska i in. 2007) Organizm niemowlęcia po stymulacji antygenowej ma zdolność do wytworzenia przeciwciał jedynie klasy IgM o małym powinowactwie, stąd w tym czasie matczyne transfer łożyskowy stanowi najważniejszy

element ochrony. Około 6 msc. życia przeważa katabolizm immunoglobulin od matki z jednoczesną niewielką syntezą własnych przeciwciał, dlatego poziomy immunoglobulin są wówczas niemal niewykrywalne. (Gołąb i in. 2002) Dojrzewanie układu odpornościowego trwa lata, wartości należne osobom dorosłym dzieci osiągają w zależności od klasy pomiędzy 1 rokiem (IgM) a 12 rokiem życia (IgA). Znaczącym aspektem, wpływającym na prawidłowy rozwój odporności humoralnej jest adekwatna stymulacja układu odpornościowego i w efekcie, możliwość utrzymania odpowiedniej równowagi między odpowiedzią komórkową i humoralną. (Czyżewska-Buczyńska i in. 2007)

3. Przegląd literatury

Selektywny niedobór IgA (SIgAD), należący do grupy pierwotnych niedoborów odporności w zakresie odpowiedzi humoralnej, jest często występującą przypadłością. Rozpowszechnienie tego schorzenia w dużej mierze zależy od populacji. Badacze wskazują, że w świecie zachodnim częstość ta wynosi 1:350-1:700 osób. (Hammarstrom et al. 2000). Prawdopodobnym podłożem patofizjologicznym SIgAD są wewnętrzne zaburzenia w obrębie komórek B IgA(+), co uniemożliwia dalsze podziały i różnicowanie do prawidłowych funkcjonalnie komórek plazmatycznych, mających zdolność do syntetyzowania IgA. Poza postacią selektywnego niedoboru IgA, obniżenie stężenia tej immunoglobuliny towarzyszyć może wielu zaburzeniom immunologicznym m.in. niedoborom podklas IgG2/IgG4, pospolitemu zmiennemu niedoborowi odporności (CVID), zespołowi hiper-IgM oraz zespołowi hiper-IgE, choć w tym ostatnim upatrywać się można innego podłoża niedoboru IgA. (Czyżewska-Buczyńska i in. 2007).

Selektywny niedobór IgA, w związku z długim procesem dojrzewania układu odpornościowego, rozpoznać możemy u pacjenta który ukończył 4 rok życia, poziom IgA w surowicy wynosi mniej niż 0,07g/l oraz wykluczono współistnienie niedoboru IgG oraz IgM. (Conley et al. 1999). Istotnym aspektem, na który warto zwrócić uwagę przy diagnozowaniu tego schorzenia jest fakt, że normy laboratoryjne poziomów przeciwciał przyjęte dla dzieci różnią się znacznie od norm dla dorosłych. W praktyce immunologa klinicznego zróżnicowanie poziomów immunoglobulin w zależności od wieku ma istotne znaczenie w procesie diagnostycznym pacjenta, u którego podejrzewa się pierwotny niedobór odporności. (Wolska-Kuśnierz i in. 2010).

Badacze wskazują, że większość osób z SIgAD z dużym prawdopodobieństwem nie dowie się o swojej chorobie, w związku z częstym przebiegiem bezobjawowym. Ci pacjenci, którzy manifestować będą objawy selektywnego niedoboru IgA, najczęściej będą prezentować: nawracające infekcje górnych dróg oddechowych, głównie o etiologii wirusowej, rzadziej bakteryjnej (głównie bakterie otoczkowe np. *S. pneumoniae*); częstsze zakażenia dróg moczowych, zakażenia przewodu pokarmowego (zwłaszcza o etiologii rotawirusowej). (Szczawińska-Popłonyk i in. 2009). Mogą pojawiać się zakażenia uszu, zatok obocznych nosa, spojówek, błony śluzowej nosa i gardła. Dużo rzadziej obserwuje się zapalenia oskrzeli i płuc o etiologii bakteryjnej, w tym przypadku zakażenia mogą powikłać się rozstrzeniemi oskrzeli. (Janzi et al. 2009). Najczęściej infekcje te będą mieć przebieg łagodny, niewymagający hospitalizacji a ich leczenie nie różni się istotnym sposobem od leczenia pacjenta bez SIgAD. Warty zasygnalizowania jest fakt, że u pacjentów z nawracającymi ZUM, zapaleniami oskrzeli i płuc, należy wykluczyć wady układów moczowego i oddechowego. (Lewandowicz-Uszyńska i in. 2013). Należy także pamiętać, że niedobór IgA może występować w przebiegu innych schorzeń lub wynikać z ich leczenia.

Istotnym zagadnieniem, podnoszonym przez wielu specjalistów jest szczególnie predyspozycja osób z selektywnym niedoborem IgA do rozwoju chorób o podłożu autoimmunizacyjnym, lub też do współistnienia tych chorób z SIgAD. (Yel 2010). Dotychczas nie udało ustalić się spójnego wyjaśnienia tego procesu. Niektórzy jako hipotezę wskazują zaburzoną odpowiedź wobec pojawiających się antygenów bakteryjnych i w związku z powyższym dysregulację układu immunologicznego i nieprawidłową, nadmierną jego aktywację. Inni autorzy z kolei skupiają się na udziale IgA w procesie odporności błon śluzowych i usuwaniu kompleksów immunologicznych, upatrując się podłoża zaburzeń w nieprawidłowej degradacji tych kompleksów, które po dostaniu się do tkanek wywołują reakcję zapalną. (Mestecky et al. 1999). Za powstanie nieprawidłowych przeciwciał, skierowanych przeciwko własnym tkankom odpowiedzialne mogą być także zaburzenia ze strony odpowiedzi przeciwwirusowej. Naukowcy wykazali, że IgA biorą udział

w wewnątrzkomórkowym niszczeniu cząstek wirusa a także w prezentacji jego antygenów, stąd zaburzenia tego procesu mogą skutkować rozwojem nieprawidłowo skierowanej reakcji układu odpornościowego (Cunningham-Rundles et al. 1981). Ostatnimi czasy liczne doniesienia wskazują na związek pomiędzy nieprawidłową mikrobiotą skóry, jelit, błon śluzowych a występowaniem objawów chorób z autoagresji. W proces kolonizacji śluzu i błon śluzowych bakteriami symbiotycznymi zaangażowane są także immunoglobuliny A. (Donaldson et al. 2018) Wiadome jest także, że IgA mają zdolność do adsorpcji antygenów przyjmowanych drogą pokarmową, w związku z tym, niedobór tej klasy immunoglobulin może ułatwiać przyleganie antygenów pokarmowych i bakteryjnych do ścian przewodu pokarmowego, w konsekwencji promować nieprawidłową, krzyżową reakcję i tworzenie przeciwciał przeciwko własnym tkankom. (Cunningham-Rundles et al. 2001). Hipotezy te potwierdzać może fakt istnienia wspólnych dla PNO i chorób z autoagresji określonych wspólnych alleli HLA (np. HLA-B8, DR3, DQ2) a więc wspólnego podłoża genetycznego. (Wang et al. 2010) Warto pamiętać, że dodatkowym współistniejącym zaburzeniem może być występowanie przeciwciał anti-IgA. Szacuje się, że posiada je 20-40% pacjentów. Obecność przeciwciał skierowanych przeciwko własnym immunoglobulinom wpływa na utrudnienie leczenia preparatami immunoglobulin dożylnych i podskórnych, stosowanych czasem w leczeniu chorób z autoagresji. (Ferreira et al. 1988)

Dużo kontrowersji wzbudza współistnienie niedoboru IgA i chorób z kręgu alergicznych. Większość publikacji potwierdza związek sIgAD z atopią, jednak niektórzy badacze negują go. Niejasnym jest także fakt, czy to niedobór immunoglobuliny promuje reakcję alergiczną, czy reakcja alergiczna osłabiając błony śluzowe w konsekwencji doprowadza do wtórnego niedoboru IgA. Do argumentów przemawiających za współistnieniem tych dwóch zjawisk zaliczyć można istnienie obniżonego poziomu IgA i sekrecyjnego IgA w wydzielinie z nosa atopików. Ponadto istnieją publikacje, które wskazują, że matki dzieci z atopią mają niższe osoczowe poziomy IgA niż w populacji oraz znacznie podwyższony poziom IgE w krwi pępowinowej. Co więcej dzieci z tendencjami do chorób alergiczych mają bardziej zaznaczony fizjologiczny niedobór IgA w okresie noworodkowym a stężenia te są tym niższe, im większe nasilenie objawów (choć zwykle pozostają w granicach wartości referencyjnych dla wieku). (Kilian et al. 1995). Ciekawą obserwacją jest również wzrost liczby komórek plazmatycznych produkujących IgA w błonie śluzowej nosa, w stosunku do placebo w wyniku różnych rodzajów immunoterapii (potocznie zwanej odczulaniem), jednak bez korelacji z klinicznym stanem pacjenta. Klinicyści zwracają uwagę na częste współistnienie niedoboru IgA z astmą oskrzelową, alergicznym nieżytem nosa, atopowym zapaleniem skóry w codziennej praktyce. (Hamera-Słynarska i in. 2001). Lista chorób autoimmunologicznych, które można spotkać u chorych na SIgAD jest długa, obejmuje m.in.: chorobę trzewną, cukrzycę t.1, chorobę Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, bielactwo, łuszczycę, młodzieńcze idiopatyczne zapalenie stawów, toczeń rumieniowaty układowy, cytopenie immunologiczne (Lewandowicz-Uszyńska i in. 2013; Wang et al. 2010).

Pacjenci, u których stwierdza się nawracające infekcje słabo reagujące na antybiotykoterapię doustną, przewlekające się, wymagające częstego leczenia szpitalnego, po wykluczeniu innych przyczyn takiego stanu powinni zostać skierowani do immunologa. Jednym z podstawowych, przesiewowych badań w diagnostyce pierwotnych i wtórnych niedoborów odporności jest ocena stężeń poszczególnych klas immunoglobulin. Po wykluczeniu zaburzeń syntezy swoistych przeciwciał, niedoboru podklas IgG, zaburzeń fagocytozy, układu dopełniacza, a więc po wykluczeniu poważniejszych przyczyn chorobowości, możemy zastanawiać się nad rozpoznaniem SIgAD. (Gołąb i in. 2002) Wg ESID (1999r) rozpoznanie pewne selektywnego niedoboru IgA stawiamy, gdy: dziecko ukończyło 4 r.ż, stężenie IgA w surowicy wynosi <2SD normy dla wieku, stężenia IgG i IgM w surowicy są w normie, odpowiedź poszczepienna w klasie IgG jest prawidłowa oraz wykluczono inne przyczyny hipogamaglobulinemii. Rozpoznanie prawdopodobne natomiast stawiamy, gdy dziecko nie ukończyło 4 r.ż, stężenie IgA w surowicy wynosi <0,07g/l, prawidłowe są stężenia IgG i IgM, odpowiedź poszczepienna jest prawidłowa oraz wykluczono inne przyczyny obniżenia poziomu IgA. (Conley et al. 1999). Mając na uwadze fakt, że częstymi schorzeniami współistniejącymi z SIgAD są choroby autoimmunologiczne, rozważyć można, w zależności od stanu klinicznego wykonanie badań wykrywających m.in.: przeciwciała przeciwjądrowe, przeciwciała

przeciwno endomysium i gliadynie, anty-TPO, anty-TG. Nie ma jednak jednoznacznych danych wskazujących na konieczność wykonywania tych badań rutynowo. Warto mieć także w pamięci, że istnieją publikacje wskazujące na zwiększone ryzyko rozwinięcia się CVID u osoby z wcześniej rozpoznany SİgAD, stąd wskazana jest wzmożona czujność u tych pacjentów w tym aspekcie.

Postawienie diagnozy selektywnego niedoboru IgA nie wpływa znacząco na postępowanie terapeutyczne u pacjentów. Podstawą pozostaje leczenie zakażeń w sposób adekwatny do ich etiologii, wieku pacjenta i stanu klinicznego, leczenie chorób współistniejących i zapobieganie rozwojowi powikłań. Nie ma jasnych wytycznych, które sugerowałyby konieczność stosowania w tym schorzeniu dłuższej i bardziej agresywnej antybiotykoterapii niż u pacjentów bez SİgAD. Konsensusu brak także w kwestii stosowania profilaktyki antybakteryjnej w tym niedoborze odporności. Znaczącą rolę w minimalizowaniu ryzyka zakażeń pełnią szczepienia ochronne. Stosowanie szczepień, zarówno żywych jak i atenuowanych jest w tym niedoborze bezpieczne i zalecane. Wskazane jest rozszerzenie standardowego kalendarza o szczepienie przeciwko *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*, *H. influenzae* oraz coroczne szczepienie przeciw grypie. Nie zaleca się włączania terapii substytucyjnej IgG (i.v, s.c) u pacjentów bez współistnienia innych zaburzeń w obrębie układu odpornościowego. (Lewandowicz-Uszyńska i in. 2013). Stosowanie preparatów immunoglobulin u osób, u których stwierdza się obecność anty-IgA niesie także zwiększone ryzyko wystąpienia wstrząsu anafilaktycznego i ciężkich reakcji alergicznych.

4. Podsumowanie i wnioski.

Osoby z selektywnym niedoborem IgA stanowią niezwykle heterogenną grupę pacjentów. Przebieg schorzenia może być zróżnicowany – od zupełnie bezobjawowego, przez manifestację pod postacią chorób z autoagresji, po nawracające ciężkie zakażenia i transformację w CVID. Fakt ten nastroża klinicyzom wielu trudności. O ile przypadkowo wykryty, bezobjawowy SİgAD nie wymaga zwykle żadnej reakcji, o tyle powstaje wiele pytań dotyczących postępowania z pacjentami, którzy objawy manifestują. Heterogenność grupy pacjentów utrudnia ustalenie klarownych wytycznych. Czy każdy pacjent z niskim poziomem IgA i współistniejącą chorobą autoimmunologiczną powinien trafić do immunologa? Kiedy niedobór IgA u dziecka jest już niedoborem a kiedy jeszcze elementem dojrzewania układu odpornościowego? Jak wyodrębnić grupę pacjentów wysokiego ryzyka progresji do CVID? Czy i jak powinno się monitorować rozwój chorób autoimmunologicznych u pacjentów z już postawioną diagnozą? Jak leczyć, czy leczyć i jaką profilaktykę zastosować u pacjentów z objawowym niedoborem IgA? Im więcej w temacie SİgAD wiemy, tym więcej pojawia się nowych pytań i problemów, na które, póki co nie mamy jednoznacznych i uniwersalnych odpowiedzi. Analiza dostępnej literatury pozwala wysnuć wniosek, że ważne jest indywidualne podejście do każdego pacjenta. Schorzenie to, choć nie należy do ciężkich niedoborów odporności, znacznie obniża jakość życia pacjentów. Potrzeba dalszych badań w tym temacie.

5. Literatura

- Conley ME, Notarangelo LD, Etezioni A (1999) Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clinical Immunology* 93: 190-197.
- Cunningham-Rundles C (2001) Physiology of IgA and IgA Deficiency. *Journal of Clinical Immunology* 21(5): 303-309.
- Cunningham-Rundles C, Brandeis WE, Pudifin DJ et al. (1981) Autoimmunity and selective IgA deficiency: relationship to antibovine protein antibodies, circulating immune complexes and clinical disease. *Clinical and Experimental Immunology* 45: 299–304.
- Czyżewska-Buczyńska A, Lewandowicz-Uszyńska A, Jankowski A (2007) IgA istotny element układu odporności – wybrane zagadnienia. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 61: 38-47.
- Donaldson GP, Ladinsky MS, Yu KB et al. (2018) Gut microbiota utilize immunoglobulin A for mucosal colonization. *Science* 360: 795-800.

- Fagarasan S, Honjo T (2003) Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature Reviews Immunology* 3: 63–72.
- Fernandez MI, Pedron T, Tournebize R et al. (2003) Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin A by neutralization of lipopolisaccharide in epithelial cells. *Immunity* 18: 739–749.
- Ferreira A, Rodriguez MC, Lopez-Trascasa M et al. (1988) Anti-IgA antibodies in selective IgA deficiency and in primary immunodeficient patients treated with gamma-globulin. *Clinical Immunology Immunopathology* 47: 199–207.
- Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek M (2002) *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN: 10; 26; 381-398; 447–463.
- Hamera-Słynarska M, Tarchalska-Kryńska B (2001) Jaka jest rola immunoglobuliny A w alergii dróg oddechowych? *Alergia Astma Immunologia* 6(4): 180-185.
- Hammarström L et al. (2000) Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clinical and Experimental Immunology* 120: 225-231.
- Janzi M, Kull I, Sjoberg R, Wan J, Melén E et al. (2009) Selective IgA deficiency in early life: association to infections and allergic diseases during childhood. *Clinical Immunology* 133: 78-85.
- Kumar A, Teuber SS, Gershwin ME (2006) Current perspectives on primary immunodeficiency diseases. *Clinical and Developmental Immunology* 13: 223–259.
- Lewandowicz-Uszyńska A, Mikołuc B, Heropolitańska-Pliszka E i in. (2013) Niedobór IgA – czy należy się go obawiać? *Pediatrics po Dyplomie* 17(1): 21-25.
- Kilian M, Husby S, Hosst A et al. (1995) Increased Proportions of Bacteria Capable of Cleaving IgA1 in the Pharynx of Infants with Atopic Disease. *Pediatric Research* 38: 182-186.
- Mestecky J, Russell MW, Elson CO (1999) Intestinal IgA: novel views on its function in the defense of the largest mucosal surface. *Gut* 44: 2–5.
- Szczawińska-Popłonyk A, Zelent A, Dachtera A (2009) Hipogammaglobulinemia u niemowląt i małych dzieci – charakterystyka kliniczna i immunodiagnostyczna. *Alergia Astma Immunologia* 15(2): 121-132.
- Wang N, Shen N, Vyse T et al. (2011) Selective IgA deficiency in autoimmune diseases. *Molecular Medicine* 17: 1383-1396.
- Wolska-Kuśnierz B, Gregorek H, Zapaśnik A i in. (2010) Wartości referencyjne stężeń immunoglobulin G, A, M i D w surowicy zdrowych dzieci i osób dorosłych, mieszkańców województwa mazowieckiego. *Standardy Medyczne* 7(3): 524-532.
- Yel L (2010) Selective IgA Deficiency. *Journal of Clinical Immunology* 30(1): 10-16.

13. Przebieg włókien nerwowych szpiku kostnego i jego wpływ na lokalizację komórek hemopoetycznych

The course of bone marrow nerve fibers and its effect on the location of hemopoietic cells

Małgorzata Piątek ⁽¹⁾, Renata Polaniak ⁽¹⁾, Wiktoria Staśkiewicz ⁽²⁾, Sylwia Jaruga - Sękowska ⁽³⁾

⁽¹⁾ Zakład Żywienia Człowieka, Katedra Dietetyki, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾ Zakład Technologii i Oceny Jakości Żywności, Katedra Dietetyki, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽³⁾ Zakład Promocji Zdrowia, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Opiekun naukowy: dr hab. n. med. Renata Polaniak

Małgorzata Piątek: gosiaczekfp@gmail.com

Słowa kluczowe: unerwienie, kość, neurotransmitter, hematopoeza

Streszczenie

Badania histologiczne unerwienia szpiku kostnego są utrudnione ze względu na ścisłe relacje pomiędzy zmineralizowaną kością a szpikiem oraz ze względu na różnice w ich twardości. Celem niniejszej pracy był przegląd literatury dotyczący opisu unerwienia szpiku kostnego i wykazanie czy przebieg włókien nerwowych ma wpływ na lokalizację komórek hemopoetycznych. Wprowadzenie do badań technik immunohistochemicznych oraz znaczników neuronalnych umożliwiło określenie czynnościowego charakteru włókien nerwowych. Szpik kostny jest unerwiony przez mielinowe i bezmielinowe, autonomiczne i czuciowe włókna nerwowe, przy czym tylko nieliczne z nich opuszczają naczynia krwionośne i kończą swój bieg między komórkami szpiku. Wszystkie naczynia krwionośne otrzymują dostawę nerwów sympatycznych i te same naczynia krwionośne, które zaopatrują zmineralizowaną kość czy okostną, kontynuują swój bieg w szpiku kostnym. Istnienie bogatego unerwienia kości sugeruje możliwość wpływu układu nerwowego na proces hematopoezy. Jednym z warunków, który dowodzi współdziałania układu krwiotwórczego i nerwowego, jest obecność i synteza neurotransmitera w zakończeniach nerwów, w pobliżu komórek hemopoetycznych. Ostatnie badania ujawniają informacje na temat możliwości regulowania dojrzewania komórek hemopoetycznych przez glutaminian, który może pochodzić z zakończeń nerwowych. Dlatego też niezbędne jest prowadzenie dalszych badań, które powinny wyjaśniać wpływ układu nerwowego na rozwój i proliferację komórek krwi.

1. Wstęp

Szpik kostny jest gąbczastą tkanką, miękką i silnie ukrwioną. Znajduje się wewnątrz jam szpikowych kości długich oraz w małych jamkach w obrębie istoty gąbczastej kości. Masa całego szpiku u osoby dorosłej wynosi około 2,5 kg. Wyróżniamy dwa rodzaje szpiku kostnego: szpik kostny żółty oraz szpik kostny czerwony. Szpik kostny żółty składa się głównie z komórek tłuszczowych (adipocytów), które nadają mu barwę. Ten rodzaj szpiku jest hematopoetycznie nieczynny i jego zawartość w organizmie osobnika wzrasta wraz z wiekiem. W szpiku kostnym czerwonym powstają elementy morfotyczne krwi, takie jak erytrocyty, leukocyty czy trombocyty. U noworodków szpik kostny czerwony wypełnia wszystkie kości. Z biegiem czasu jego ilość się zmniejsza, a występowanie ogranicza do kości płaskich: żeber, mostka, kręgow, kości czaszki, kości miednicy i łopatek oraz nasad kości długich. W czasie rozwoju embrionalnego ssaków narządami krwiotwórczymi są wątroba płodowa i pęcherzyk żółtkowy (Ostrowski 1988).

Podstawową jednostką budulcową szpiku kostnego jest tkanka siateczkowata pochodzenia mezenchymalnego oraz naczynia włosowate o specjalnej budowie: o cienkich ściankach

i zatokowych poszerzeniach. Elementy siateczki tworzą sieć, w której oczkach zawieszono są komórki hemopoetyczne. Szpik kostny czerwony tworzą dwa przedziały - naczyniowy i hemopoetyczny. Przedział naczyniowy tworzą tętnice, liczniejsze żyły, a przede wszystkim naczynia zatokowe szpiku, których ścianę tworzą ściśle przylegające do siebie komórki śródbłonka. Na zewnętrznej powierzchni naczynia, bezpośrednio na śródbłonku, leży nieciągła warstwa komórek siateczki zwanych komórkami przydankowymi, które są strukturalnym łącznikiem przedziału naczyniowego i hemopoetycznego. Naczynia zatokowe szpiku kostnego są miejscem, gdzie odbywa się przechodzenie komórek ze szpiku do krwi (Sawicki 1993).

Przedział hemopoetyczny tworzy zrąb, który zbudowany jest z tkanki łącznej siateczkowej oraz znajdujące się w jego sieci komórki układu krwiotwórczego wszystkich linii w różnych stadiach rozwojowych. Komórki zrębu tworzą specyficzne mikrośrodowisko, które warunkuje podziały, różnicowanie, jak i dojrzewanie elementów hemopoetycznych (Boulais i Frenette 2015; Sawicki 1993).

Środowisko krwiotwórcze szpiku tworzą elementy morfotyczne, takie jak komórki zrębu i substancja pozakomórkowa m.in. w postaci włókien oraz czynniki molekularne: cytokiny, czynniki wzrostu, chemokiny, które wydzielane są do mikrośrodowiska przez komórki zrębu. Opisywane mikrośrodowisko krwiotwórcze szpiku jest strukturą uporządkowaną, które reguluje hematopoezę m.in. poprzez występowanie nisz szpikowych (Boulais i Frenette 2015; Calvi i Link 2015; Garcia-Garcia i Mendez-Ferrer 2017). Nisze komórek macierzystych są zlokalizowane w jamie szpikowej, głównie w okolicy okostnej wewnętrznej (endosteum) (Kopeć-Szlęzak 2003).

2. Opis zagadnienia

Badania dotyczące lokalizacji różnych populacji komórek hemopoetycznych w szpiku kostnym wykazały, że zespoły tych komórek nie są rozmieszczone przypadkowo, lecz układają się w ścisłym kontakcie z przedziałem naczyniowym szpiku. Brak jest natomiast wiarygodnych informacji, które potwierdzałyby istnienie zależności między lokalizacją tych komórek w szpiku, a rozmieszczeniem włókien nerwowych. Dlatego celem niniejszej pracy był przegląd literatury dotyczący opisu przebiegu włókien nerwowych w szpiku kostnym i wykazanie jego związku z lokalizacją i rozwojem komórek hemopoetycznych.

3. Przegląd literatury

3.1 Unerwienie szpiku kostnego

Badania dotyczące unerwienia szpiku kostnego mają już wieloletnią historię. W latach 30 ubiegłego stulecia de Castro wykazał, że nerwy wnikają do jamy szpikowej wraz z tętnicą odżywczą, rozgałęziają się i przebiegają wzdłuż tętniczek szpiku, w formie gęstej sieci (Dąbrowski 1998). Późniejsze badania udowodniły, że kość jest bogato unerwiona, a włókna nerwowe biegną wzdłuż naczyń krwionośnych, w sąsiedztwie komórek hemopoetycznych i komórek tkanki kostnej. Doświadczenia przeprowadzone na szczurach, wykazały, że w części trzonowej kości przez otwór odżywczy wraz z tętnicą wchodzi głównie włókna bezmielinowe. W okostnej 15 i 25 dniowych szczurów widoczne były głównie włókna bezmielinowe, podczas gdy w śródkostnej obserwowano pewną ilość włókien mielinowych w sąsiedztwie osteoblastów. W szpiku wykazano obecność jedynie bezmielinowych włókien biegnących pomiędzy komórkami hemopoetycznymi. U szczurów tuż po urodzeniu nie wykryto włókien mielinowych zarówno w szpiku jak i w endosteum (śródkostnej) (Serre i in. 1999).

Na określenie topografii unerwienia narządu kostnego pozwoliła metoda impregnacji srebrowej, to właśnie dzięki niej Thurston opisał u psa i szczura obecność licznych włókien nerwowych w jamie szpikowej, okostnej, a także w kanałach naczyniowych strefy korowej kości oraz w okostnej, w najbliższym sąsiedztwie chrząstki wzrostowej. Jednakże dokładniejsze zbadanie charakteru tych włókien okazało się niemożliwe ze względu na mało rozwinięte techniki histologiczne. Większość włókien występujących w szpiku była związana z naczyniami, ale obecne były także odgałęzienia przebiegające w mięszu tkanki. Wprowadzenie do badań technik immunohistochemicznych oraz znaczników neuronalnych przenoszonych za pośrednictwem

transportu aksonalnego było przełomem, który pozwolił na określenie czynnościowego charakteru tych włókien. Na tej podstawie wyróżniono dwa podstawowe rodzaje włókien nerwowych: włókna czuciowe i włókna układu sympatycznego (Gajda 2003).

Yamazaki i Allen analizując zdjęcia z mikroskopu elektronowego wykazali, że włókna nerwowe szpiku zawierają zarówno zmielinizowane, jak i niezmielinizowane aksony, które kończą swój bieg głównie między komórkami przydatki tętnic. Niektóre również, choć był to mniejszy procent, rozprzestrzeniają się do ścian zatok szpikowych i do parenchymy hematopoetycznej. Badania te dostarczyły więcej informacji dotyczących unerwienia szpiku kostnego i relacji pomiędzy zakończeniami nerwów, a składnikami mikrośrodowiska szpikowego (Yamazaki i Allen, 1990).

Wszystkie naczynia krwionośne otrzymują dostawę nerwów sympatycznych i te same naczynia krwionośne, które zaopatrują zmineralizowaną kość czy okostną, kontynuują swój bieg w szpiku kostnym. Podobnie, włókna czuciowe, które uwalniają substancję P (SP) i peptyd związany z genem kalcytoniny (CGRP), towarzyszą noradrenergicznym sympatycznym włóknom wzdłuż tych samych naczyń krwionośnych, które zaopatrują otaczającą kość i są dalej rozprzestrzenione w obrębie szpiku kostnego (Nance i Sanders 2007).

Dzięki podwójnym barwieniom immunohistochemicznym wykazano, że wszystkie komórki SP - immunopoztywne zawierają CGRP, a przeważająca większość komórek CGRP - immunoreaktywnych wykazuje obecność SP (Gajda 2003, Gajda i in.2005, Nance i Sanders 2007).

3.2 Markery neuronalne i neurotransmitery

W badaniach rozwoju unerwienia szpiku kostnego bardzo cenne są markery wzrastających włókien nerwowych oraz neuroprzebieżniki zarówno w obwodowym, jak i ośrodkowym układzie nerwowym.

GAP-43

Białko związane ze wzrostem o m. cz. 43 kD (growth-associated protein 43, GAP-43, GAP) zwane także B-50, F-1, pp46 lub neuromoduliną, jest fosfoproteidem zlokalizowanym w wewnętrznej blaszce błony komórkowej aksonów. GAP-43 jest odpowiedzialny za wzrost aksonu oraz wydzielanie neuromediatorów przez synapsy. Wysoką ekspresję tego białka stwierdzono we wzrastających aksonach podczas rozwoju płodowego i postnatalnego, a także w regenerujących włóknach nerwowych po ich uszkodzeniu. U dojrzałych osobników GAP-43 był opisany w różnych częściach centralnego systemu nerwowego, gdzie odpowiada za procesy plastyczności i synaptogenezy. Przeciwciała skierowane przeciwko GAP-43 były wykorzystywane do immunohistochemicznego uwidocznienia wzrastających włókien nerwowych w układzie kostno-stawowym (Gajda 2003).

PGP 9,5

PGP 9.5 to tzw. białkowy produkt genu, białko enzymatyczne o masie cząsteczkowej 9.5 kD należące do grupy hydrolaz ubikwitynowych. Występuje ono we wszystkich populacjach komórek nerwowych i w komórkach neuroendokrynowych. Wykorzystywane jest jako marker zakończeń nerwowych. Dzięki zastosowaniu przeciwciała przeciwko temu antygenowi opisano rozwój unerwienia kości u szczurów (Gajda i in. 2005).

Neuropeptyd Y

Neuropeptyd Y (NPY) powszechnie występuje jako ważny neuroprzebieżnik, zarówno w obwodowym, jak i ośrodkowym układzie nerwowym. W tkankach obwodowych znajduje się przede wszystkim w neuronach współczulnych współwystępując z noradrenaliną. Spotykany jest także w części neuronów przywspółczulnych. W ośrodkowym układzie nerwowym znajduje się w korze mózgowej i strukturach limbicznych w lokalnych hamujących neuronach, w neuronach noradrenergicznych pnia mózgu, w grupie boczno-nakrywkowej neuronów adrenergicznych dających projekcje do jądra przykomorowego podwzgórza oraz w neuronach miejsca sinawego, których zakończenia mają miejsce we wzgórzu (Bobińska i in. 2008). Wysoki poziom NPY u szczurów wykazano również w komórkach krwi, szpiku kostnym i śledzionie. Wykazano ekspresję NPY w megakariocytach, co zostało potwierdzone metodą hybrydyzacji in situ (Gajda 2003).

Glutaminian

Glu (glutaminian) jest głównym neurotransmiterem w ośrodkowym układzie nerwowym kręgowców. Komórki nerwowe używające glutaminianu jako neurotransmitera zawierają odpowiednie receptory GluR (ang. glutamate receptor) oraz pęcherzykowe transportery glutaminianu VGLUT (ang. vesicular glutamate transporter). Działanie Glu polega na jego wiązaniu się do receptorów błonowych, co indukuje wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia i aktywację różnych kaskad sygnałowych. U szczurów zaobserwowano szczególnie duże ilości wolnego Glu w osteoblastach oraz w częściach przynasadowych kości, a także w sąsiedztwie nerwów biegnących w szpiku kostnym przy komórkach kości oraz wzdłuż naczyń krwionośnych. Jednakże nie wykryto wolnego Glu w osteoklastach, komórkach endotelialnych oraz hemopoetycznych. Pochodzenie Glu w kościach jest nieznane, jakkolwiek powstały hipotezy dotyczące jego uwalniania. Jedna z nich sugeruje, że jest on uwalniany przez komórki kości, gdzie działa na zasadzie oddziaływań parakrynnych. Druga, bardziej prawdopodobna sugeruje, że jest on uwalniany z zakończeń nerwowych. Obecność wolnego Glu w szpiku kostnym sugeruje, że może on również wpływać na proces hematopoezy (Serre i in. 1999).

3.3 Powiązanie unerwienia szpiku kostnego z lokalizacją komórek hemopoetycznych.

Zależności anatomiczne pomiędzy układem krwionośnym i nerwowym w tkankach przedstawia się często w postaci sieci naczyniowo-nerwowej, która pokazuje nerwy towarzyszące dużym i małym naczyniom krwionośnym, zarówno tętnicznym jak i żylnym (Schmid-Schonbein i in.1980).

Nisze komórek macierzystych i progenitorowych są zlokalizowane w jamie szpikowej, głównie w okolicy okostnej wewnętrznej (czyli endosteum), natomiast dojrzewające komórki prekursorowe linii granulocytarnej występują blisko naczyń (Kopeć-Szlezak 2003). Zespoły komórek hemopoetycznych nie są rozrzucone przypadkowo, lecz układają się w szpiku według pewnego schematu. Megakariocyty leżą w bezpośrednim kontakcie ze ścianami zatok żylnych, do których światła uwalniają płytki krwi (Calvi i Link 2015, Yamazaki 1990). Erytropoeza zachodzi również w pobliżu naczyń, natomiast komórki linii granulopoetycznej mają tendencję do zajmowania przestrzeni wokół tętniczek, a także w pobliżu beleczek kostnych (Nilsson i in. 2001).

Naito i wsp. stworzyli komputerowe mapy lokalizacji różnych elementów komórkowych szpiku, w powiązaniu z jego unaczynieniem. Stwierdzili oni, że komórki granulocytarne występują głównie wokół ścian tętniczki centralnej, komórki erytrocytarne wokół ścian zatok szpikowych, do których ścian są przytwierdzone megakariocyty. Na dwuwymiarowych skrawkach szpiku kostnego, erytroblasty organizują się często w skupiska, odseparowane od siebie. Na obrazach trójwymiarowych szpiku skupiska erytroblastów nie tworzą oddzielnych wysepek, ale wydłużone sznurki (Naito i in. 1992).

Jednym z warunków, który dowodzi współdziałania układu krwiotwórczego i nerwowego, jest obecność i synteza neurotransmitera w zakończeniach nerwów, w pobliżu komórek hemopoetycznych. Komórki szpiku muszą posiadać więc receptory dla tych przekaźników. Są to odpowiednio receptory dla CGRP na komórkach szpiku myszy czy receptory β_2 adrenergiczne na limfocytach, granulocytach i monocytach (Dąbrowski 1998).

Hematopoetyczne komórki macierzyste tkwiące w szpiku kostnym, kontrolują przeżycie, proliferację, samoodnawianie i różnicowanie w szpiku kostnym. U normalnych osobników stały ruch komórek macierzystych pomiędzy szpikiem a przedziałami krwionośnymi przyczynia się do utrzymania normalnej hematopoezy. Jednak mechanizmy regulujące ten kluczowy proces są w większości nieznane. Uwalnianie komórek macierzystych ze szpiku głównie zależy od systemu nerwowego. Brak galaktozylotransferazy, która znajduje się w oligodendrocytach i komórkach Schwanna, powoduje odbiegające od normy przewodnictwo nerwowe i praktycznie brak uwalniania komórek macierzystych, następującego zwykle po zadziałaniu czynnika stymulującego wzrost kolonii granulocytowych (G-CSF). Farmakologiczne lub genetyczne usunięcie adrenergicznej neurotransmisji dowodzi, że noradrenalina kontroluje G-CSF, a tym samym mobilizację komórek. Podanie β_2 -agonisty adrenergicznego wznowia mobilizację i u kontrolnych myszy i u tych

z deficytem noradrenaliny. Badania dowodzą, że współczulny układ nerwowy reguluje przyciąganie komórek macierzystych do ich nisz szpikowych (Katayama i in. 2005).

Występowanie komórek hemopoetycznych w pobliżu nerwów przemawia za wpływem substancji uwalnianych przez zakończenia nerwowe na te komórki. Istnieją przypuszczenia, że rozwój komórek linii megakariocytarnej zależy od obecności glutaminianu, który może pochodzić z zakończeń nerwowych. Genever i wsp. wykazali na powierzchni megakariocytów, pochodzących z rozmazów szczurzego i ludzkiego szpiku, obecność receptora dla glutaminianu typu NMDA. Na komórkach linii megakariocytarnej wykryli również obecność przENOŚnika glutaminianu i asparaginianu (GLAST). Dzięki analizom z cytometru przepływowego badacze ci wykazali, że aktywność receptora NMDA była niezbędna do prawidłowego różnicowania komórek megakarioblastycznych. Blokada tego receptora poprzez użycie antagonisty MK-801 powodowała zmniejszenie rozmiarów oraz adhezji komórek megakarioblastycznych (Genever i in. 1999).

Badania wykonane *in vitro* potwierdzają wpływ katecholamin na rozwój linii czerwonekrwinkowej. W stężeniach spotykanych w warunkach normalnych zarówno adrenalina, jak i noradrenalina wywierają pobudzający wpływ na rozwój kolonii erytrocytarnych, ale w wysokich stężeniach wyraźnie hamują ich rozwój. Znaczenie amin katecholowych dla prawidłowego rozwoju linii czerwonekrwinkowej *in vivo* potwierdzają również obserwacje występowania anemii u chorych z niewydolnością układu sympatycznego. Ciągłe jednak brakuje potwierdzenia istnienia anatomicznego podłoża do zachodzenia interakcji pomiędzy komórkami hemopoetycznymi a zakończeniami nerwowymi. W wielu chorobach neurologicznych związanych z dysfunkcją układu sympatycznego obserwuje się anemię, co potwierdziły badania Ando i wsp. Zaobserwowali oni również, że stopień anemii zmniejszył się po kilku iniekcjach erytropoetyny, co z kolei sugeruje, że erytropoeza i dysfunkcja układu sympatycznego mogą być mocno ze sobą powiązane (Ando i in. 1996).

Hermans i Opstelten opisali erytroblasty w szpiku kostnym szczura, wykorzystując przeciwciała anti-HIS49, które reaguje z erytrocytami, jak z ich prekursorami. Komórki te były praktycznie nieobecne w częściach peryferyjnych (subendosteum) szpiku, czyli tam gdzie było dużo innych prekursorów hematopoezy, gdyż rejon ten nie jest najwyraźniej korzystny dla różnicowania się erytroblastów. W pozostałych częściach szpiku, komórki HIS49+ były obecne często w dużych skupieniach. Hermans i Opstelten stwierdzili również, że prekursor erytrocytów występują w bliskim sąsiedztwie makrofagów, wybarwionych za pomocą przeciwciała ED2. Stwierdzili oni, że około 90% zawieszonych w szpiku komórek HIS49+ ma na swojej powierzchni fragmenty makrofagów ED2+, to sugeruje bliski związek pomiędzy tymi dwoma typami komórek (Hermans i Opstelten 1991).

4. Podsumowanie

- a) Komórki hemopoetyczne występują w powiązaniu z systemem naczyniowym szpiku kostnego.
- b) Włókna nerwowe biegną przy naczyniach krwionośnych szpiku, jak również penetrują do jego części hematopoetycznej, co sugeruje ich wpływ na komórki krwi.
- c) Lokalizacja komórek hemopoetycznych jest skorelowana z przebiegiem włókien nerwowych szpiku.
- d) Neurotransmitery uwalniane z zakończeń nerwowych mogą wpływać na lokalizację i dojrzewanie komórek hemopoetycznych w szpiku kostnym.

Wpływ układu nerwowego na rozwój i proliferację komórek krwi nadal nie jest do końca poznany. Obecność włókien nerwowych w pobliżu naczyń z pewnością jest jednym z czynników wpływających na rozmieszczenie komórek hemopoetycznych szpiku poprzez uwalnianie neurotransmitery. Konieczne więc wydaje się prowadzenie dalszych badań w celu wyjaśnienia wpływu układu nerwowego zarówno na procesy hematopoezy, jak również na rozmieszczenie poszczególnych linii komórkowych w szpiku.

5. Literatura

- Ando Y, Asahara K, Obayashi K i in. (1996) Autonomic dysfunction and anemia in neurologic disorders. *J. Auton Nerv Syst* 61(2):145–148.
- Bobińska K, Szemraj J, Pietras T i in. (2008) Neuropeptyd Y -budowa, receptory, działanie i miejsce w psychiatrii. *Psychiatria Polska Tom XLII, numer 6:889–901.*
- Boulais PE, Frenette PS (2015) Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* 125: 2621–2629.
- Calvi LM, Link DC (2015) The hematopoietic stem cell niche in homeostasis and disease. *Blood* 126:2443-51.
- Dąbrowski Z (1998) *Fizjologia krwi. Wybrane zagadnienia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 215-226
- Gajda M (2003) Immunohistochemiczna charakterystyka włókien nerwowych zaopatrujących kości piszczelowe szczura w trakcie rozwoju osobniczego. *Rozprawa doktorska, Collegium Medicum UJ, Kraków.*
- Gajda M, Litwin JA, Cichocki T i in. (2005) Development of sensory innervation in rat tibia: co-localization of CGRP and substance P with growth-associated protein 43 (GAP-43). *J Anat* 207:135-144.
- Garcia-Garcia A, Mendez –Ferrer S (2017) *Advances in Stem Cells and their Niches, Chapter Three-The Role of the CNS in the regulation of HSC 1: 35-57.*
- Genever PG, Wilkinson D, Patton AJ i in. (1999) Expression of a functional N-methyl-D-aspartate-type glutamate receptor by bone marrow megakaryocytes. *Blood* 93:2876-2883.
- Hermans MH, Opstelten D (1991) In situ visualization of hemopoietic cell subsets and stromal elements in rat and mouse bone marrow by immunostaining of frozen sections. *J Histochem Cytochem.* 39: 1627-1634.
- Katayama Y, Battista M, Kao WM i in. (2005) Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 124:407-421.
- Kopeć- Szlęzak J (2003) Mikrośrodowisko krwiotwórcze szpiku. *Onkol Pol* 2:71-76.
- Naito K, Tamahashi JN, Chiba T i in. (1992) The microvasculature of the human bone marrow correlated with the distribution of hematopoietic cells. A computer assisted three dimensional reconstruction study. *Tohoku J Exp Med* 166:439-450.
- Nance DM, Sanders VM (2007) Autonomic innervation and regulation of the immune system. *Brain, Behavior and Immunity* 21:736-745.
- Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA (2001) Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* 97:2293-2299.
- Ostrowski K (1988) *Histologia*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 310-337.
- Sawicki W (1993) *Histologia*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 141-154.
- Schmid-Schonbein H, Grunau G, Brauer H (1980) The physiology of the functional „vessel- blood” unit 1, *Exempla Haemorheologica*, 48.
- Serre C.M, Farlay D, Delmas PD i in. (1999) Evidence for a dense and intimate innervation of the bone tissue, including glutamate-containing fibers. *Bone* 25:623-629.
- Yamazaki K, Allen T.D (1990) Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells and the recognition of a novel anatomical unit: the neuro-reticular complex. *J Anat* 187:261-276.

Wykaz używanych skrótów

- CGRP (ang. calcitonin-gene related peptide) – peptyd związany z genem kalcytoniny
- GAP-43 (growth-associated protein 43, GAP-43, GAP) - białko związane ze wzrostem o m. cz. 43 kD
- G-CSF (ang. granulocyte colony stimulating factor) – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
- GLAST (ang. glutamate aspartate transporter) – przekaźnik dla glutaminianu i asparaginianu

Glu (ang. glutamate) -glutaminian

GluR (ang. glutamate receptor) – receptory glutaminianu

MK-801 (ang. dizocilpine) -dizocylpina, antagonist receptora NMDA

NMDA (ang. N-methylo-D-aspartate) – N-metylo-D-asparaginian

NPY (ang. neuropeptide Y) – neuropeptyd Y

PGP 9.5 (ang. protein gene product 9.5) – białkowy produkt genu o m.cz. 9.5 kD

SP (ang. substance P) – substancja P

VGLUT (ang. vesicular glutamate transporter)- pęcherzykowe transportery glutaminianu

14. Układ nerwowy a rola endogennych peptydów uwalnianych z białek żywności

The nervous system and the role of endogenous peptides released from food proteins

Marta Sobolczyk

Katedra Chemii i Biochemii Medycznej, Zakład Chemii Biomolekularnej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Opiekun naukowy: dr hab. Renata Perlikowska

Marta Sobolczyk: martasobolczyk@wp.pl

Słowa kluczowe: egzorfina, β -kazomorfinina, β -konglicynina, rubiskolina, receptor opioidowy

Streszczenie

Receptory opioidowe znajdują się w wielu regionach mózgu, rdzenia kręgowego oraz w tkankach obwodowych. Ich endogenne i egzogenne ligandy, w tym peptydy opioidowe, są zaangażowane w szereg procesów fizjologicznych. Ciekawą grupę o szerokim potencjale stanowią peptydy uwalniane z białek żywności, wskutek hydrolizy enzymami trawiennymi. Pośród białek żywności głównymi prekursorami peptydów opioidowych są białka mleka, gluten pszeniczny, β -konglicynina soi, oraz enzym RuBisCO pochodzący ze szpinaku. Dotychczasowe badania potwierdzają udział większości peptydów opioidowych w regulacji ośrodkowego układu nerwowego, co wiąże się z działaniem przeciwbólowym, wpływem na lęk, emocje i pamięć.

1. Wstęp

Pierwsze doniesienia na temat przeciwbólowego działania endogennego układu opioidowego sięgają lat 70. XX wieku. W toku tych osiągnięć, naukowcy badający mechanizm działania morfiny wysunęli hipotezę o istnieniu trzech głównych grup receptorów opioidowych: μ , δ oraz κ (kodowanych odpowiednio przez geny Oprm1, Oprd1 i Oprk1), co pozwoliło na lepsze zrozumienie molekularnych i farmakologicznych zastosowań opioidów (Akil i in. 1998). Późniejsze badania dostarczyły informacji o istnieniu receptora nocycetyliny, charakteryzującego się jednakże niskim powinowactwem wobec standardowych ligandów opioidowych (Mollereau i in. 1994; Malfacini i in. 2015). Receptory opioidowe należą do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G (ang. G protein-coupled receptor, GPCR), złożonych z siedmiu domen transbłonowych, a ich obecność potwierdzono w układzie nerwowym, jak i w tkankach obwodowych, w tym w sercu, płucach, wątrobie, przewodzie pokarmowym czy układzie rozrodczym (Wittert i in. 1996; Villemagne i in. 2002). Receptory typu μ pośredniczą przede wszystkim w szlakach neuroendokrynych oraz warunkują odczuwanie bólu i analgezji. Z kolei receptory typu δ regulują zachowanie emocjonalne i aktywność behawioralną. Co więcej udowodniono również występowanie innych sygnałów odbieranych przez receptory opioidowe, które obejmują: reakcję na stres, niedociśnienie, zmiany temperatury ciała, a także wpływ na ośrodek sytości, spadek wydzielania soku żołądkowego i zachowania seksualne (Kitts i in. 2003).

Biorąc pod uwagę fakt, że zastosowanie tradycyjnych opiatów i opioidów w większości wiąże się z wystąpieniem efektów ubocznych (np. zawrotów głowy, nudności, zaparc, tolerancji farmakologicznej, uzależnienia), poszukuje się zatem wciąż nowych rozwiązań. Wydawać by się mogło, że białka żywności służą tylko jako źródło cennych wartości odżywczych, niemniej jednak dowody wskazują o możliwości wyselekcjonowania odpowiednich sekwencji peptydowych, które również potrafią modulować fizjologiczne funkcje organizmu. W ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci zidentyfikowano szeroki zakres bioaktywnych peptydów pochodzących z żywności, o wielu korzystnych działaniach dla zdrowia, biorących udział w zapobieganiu ryzyku wystąpienia chorób przewlekłych i zapewnieniu ochrony immunologicznej (Kitts i Weiler 2003). Pomimo, iż struktury i funkcje bioaktywnych peptydów nie są do końca znane, znaczna część ma wspólne właściwości. Na

przykład większość z tych peptydów zbudowana jest z krótkiej sekwencji obejmującej od 2 do 20 aminokwasów, która na ogół jest bogata w aminokwasy hydrofobowe (prolinę, fenyloalaninę, valinę).

Poniżej przedstawiono charakterystykę najszerszej przebadanych peptydów endogennych o aktywności opioidowej, uwalnianych wskutek degradacji enzymatycznej białek z produktów roślinnych jak i mlecznych. Omówiona została ich rola w obrębie centralnego układu nerwowego.

1.1 Bioaktywne peptydy w żywności

Egzorfiny po raz pierwszy wyselekcjonowane zostały 1979r. przez Zioudrou i wsp. (Fukudome i Yoshikawa 1992) w wyniku degradacji enzymatycznej glutenu, białka pochodzącego ze zboża pszenicznego. Ze względu na odmienną strukturę zostały podzielone na trzy grupy: A (egzorfina A4, o sekwencji Gly-Tyr-Tyr-Pro i A5, o sekwencji Gly-Tyr-Tyr-Pro-Thr), B (egzorfina B4, o sekwencji Tyr-Gly-Gly-Trp i B5, o sekwencji Tyr-Gly-Gly-Trp-Leu) oraz C (egzorfina C, o sekwencji Tyr-Pro-Ile-Ser-Leu) (tab.1). Na podstawie testów bazujących na wycinkach jelita cienkiego świnki morskiej (ang. guinea-pig ileum, GPI) i izolowanych nasieniowodach myszy (ang. mouse vas deferens, MVD) wykazano, iż egzorfiny charakteryzują się zróżnicowanym powinowactwem do receptorów opioidowych. Egzorfiny A oraz B były selektywne dla receptora typu δ , w tym sekwencja B5, która różni się zaledwie jednym aminokwasem od egzogennej Leu-enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) wykazał najsilniejszą aktywność. Natomiast egzorfina typu C charakteryzowała się wysokim powinowactwem do receptora μ -opioidowego (Fukudome i Yoshikawa 1992; Fukudome i in. 1997).

W 2001 roku w skutek degradacji enzymatycznej białka karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCo), wyizolowanego z liści szpinaku otrzymano dwa endogenne peptydy o aktywności opioidowej zwane rubiskolinami, charakteryzujące się następującymi sekwencjami: Tyr-Pro-Leu-Asp-Leu, określona rubiskoliną-5 i Tyr-Pro-Leu-Asp-Leu-Phe, nazwana analogicznie rubiskoliną-6 (tab.1) (Yang i in. 2001). RuBisCo jako enzym katalizujący pierwszy etap cyklu Calvina w fazie ciemnej, występuje wśród większości organizmów autotroficznych przeprowadzających fotosyntezę oraz fotooddychanie, dlatego też rubiskoliny mogą charakteryzować się wysoką biodostępnością.

Natomiast sojmorfiny-5,-6,-7 pochodzące z izolatu białka sojowego, β -konglicyniny, z racji swojej sekwencji Tyr-Pro-Phe-Val na N-końcu, przypominają strukturę β -kazomorfiny wchodzącej w skład β -kazeiny produkowanej przez mleko matki (tab.1). Sojmorfiny znane są jako pierwsze opioidowe peptydy pochodzenia roślinnego o specyficznym powinowactwie do receptorów opioidowych typu μ . Badanie GPI dowiodło, że sojmorfiny mogą być bardziej selektywne do tego typu receptora niż β -kazomorfiny występujące u człowieka (Ohinata i in. 2007).

Ostatnią grupą są kazomorfiny, peptydy o właściwościach opioidowych, wyizolowane na skutek proteolizy białek mleka, β -kazein. Pierwszym zidentyfikowanym tego typu opioidem była β -kazomorfina-7 (o sekwencji Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) jako produkt degradacji enzymatycznej bydłowej β -kazeiny. Wysoką aktywnością cechują się również jego syntetyczne analogi: -4, -5 i -6, które powstały odpowiednio w wyniku usuwania reszt/-y aminokwasowych/-ej z C-końca peptydu (tab.1) (Brantl i in. 1981). Wśród nich β -kasomorfina-5 wykazała największą aktywność w testach aktywności opioidowej GPI oraz MVD.

2. Przegląd literatury

2.1 Przeciwbólowe właściwości peptydów

Najbardziej znaną rolą opioidów jest ich działanie przeciwbólowe, wynikające z pobudzenia receptorów opioidowych zlokalizowanych w różnych miejscach ośrodkowego układu nerwowego i tkanek obwodowych. Wiele dowodów wskazuje, że białka pokarmowe wykazujące podobieństwo strukturalne do endogennych opioidów mogą być rozpoznawane przez receptory opioidowe. Wobec czego, ich działanie molekularne i fizjologiczne jest podobne do opioidów.

W celu określenia właściwości przeciwbólowych β -kazomorfina (-3, -4, -5, -6 i -7), przeprowadzone zostały testy behawioralne na myszach: test wokalizacji indukowany prądem (current-induced vocalization test), gorącej płytki (hot plate) i „rzucania” ogona (tail pinch), po podaniu dokomorowym (icv) oraz dooponowym (it). Działanie przeciwbólowe wykazywały

wszystkie kazomorfiny, z wyjątkiem β -kazomorfiny-3, a efekt ten był blokowany poprzez podanie silnego antagonisty receptorów opioidowych, naloksonu, co potwierdzało udział receptorów opioidowych w przekazywaniu sygnału przeciwbólowego. Ponadto badania z roku 2015 sugerują, że β -kazomorfina-5 i -7, mogą przekraczać barierę krew-mózg, bowiem peptydy te były aktywne przeciwbólowo po podaniu dootrzewnowym (ip) u szczurów (Blass i Blom 1996; Lister i in. 2015).

Tab.1. Przykłady peptydów opioidowych z uwalnianych z białek żywności.

endogenny peptyd	źródło	sekwencja
egzorfina A4	pszeniczny gluten	Gly-Tyr-Tyr-Pro
egzorfina B4	pszeniczny gluten	Tyr-Gly-Gly-Trp
egzorfina B5	pszeniczny gluten	Tyr-Gly-Gly-Trp-Leu
egzorfina C	pszeniczny gluten	Tyr-Pro-Ile-Ser-Leu
β-kazomorfina-4	kazeina	Tyr-Pro-Phe-Pro
β-kazomorfina-5	kazeina	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly
β-kazomorfina-6	kazeina	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro
β-kazomorfina-7	kazeina	Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile
rubiskolina-5	RuBisCo	Tyr-Pro-Leu-Asp-Leu
rubiskolina-6	RuBisCo	Tyr-Pro-Leu-Asp-Leu-Phe
sojmorfina-5	β -konglicynina	Tyr-Pro-Phe-Val-Val
sojmorfina-6	β -konglicynina	Tyr-Pro-Phe-Val-Val-Asn
sojmorfina-7	β -konglicynina	Tyr-Pro-Phe-Val-Val-Asn-Ala

Rubiskolina-6 była aktywna w teście „rzucania” ogona nie tylko po podaniu icv (1 nmol/zwierzę), ale co ciekawsze działał przeciwbólowo również po podaniu doustnym (100 mg/kg). Najsilniejsza odpowiedź obserwowana była po 10 min od podania icv, a czas trwania tego efektu wynosił około 30 min (Yang i in. 2011). Działanie przeciwbólowe rubiskoliny-6 po podaniu icv było hamowane przez jednoczesne podanie antagonisty opioidowego δ , naltrindolu w dawce 1 mg/zwierzę (podskórnym, sc), co świadczyło o udziale receptorów δ w przekazywaniu działania analgetycznego badanego peptydu (Yang 2011).

Białko glutenowe, egzorfina A5, po podaniu icv wywołało łagodne działanie przeciwbólowe zależne od dawki; najlepszy efekt otrzymano dla dawki 300 μ g/zwierzę (Takahashi 2000). Jednak działanie peptydu było za słabe by wzocnić efekt przeciwbólowy morfiny podanej podskórnym w dawce 10 mg/kg, co wynikać mogło z niższej aktywności opioidowej egzorfiny A5 i jej selektywności wobec receptorów δ opioidowych. Ponadto egzorfina A5 po podaniu ip zniosła działanie endogennego układu przeciwbólowego, co potwierdzono w testach indukujących analgezję, będącą wynikiem dodatkowego stresu (footshock stress, FS, oraz socio-psychological stress with communication box, PSY).

2.2 Wpływ peptydów na procesy uczenia się i zapamiętywania

Lokalizacja oraz charakterystyka farmakologiczna receptorów opioidowych sugeruje, że mogą one brać udział w procesach uczenia się i zapamiętywania. Spośród endogennych peptydów

opiodowych obiecujące wyniki otrzymano m.in. dla egzorfiny A5. W celu określenia wpływu tego peptydu na proces uczenia się i pamięć przeprowadzono test biernego unikania na myszach szczepu ddY (one-trial step-through type passive avoidance test) (Takahashi 2000). Doustne podanie egzorfiny-5 w dawce 300 mg/kg po 24 h od treningu miało stymulujący wpływ na proces uczenia się i konsolidację pamięci.

Podobną zależność w teście biernego unikania zaobserwowano w przypadku rubiskoliny-6 (Yang 2003), dla której wykres zależności dawka-efekt miał kształt dzwonowy, a maksymalna odpowiedź dotyczyła dawki 3 nmol/zwierzę po podaniu icv oraz dawki 100 mg/kg po podaniu doustnym. Odpowiedź została zahamowana przez antagonistę receptorów δ -opiodowych, naltrindol (1 mg/zwierzę, sc), co udowodniło istotność receptorów δ w mechanizmach wzmacniania pamięci.

Obiecujące wyniki otrzymano również dla β -kazomorfiny-5. W celu określenia wpływu tego peptydu na pamięć krótkotrwałą i długotrwałą przeprowadzono test pamięci krótkotrwałej bazujący na spontanicznej eksploracji labiryntu Y (spontaneous alternation behavior in the Y-maze) oraz test pamięci długotrwałej biernego unikania (step-down-type passive avoidance) (Sakaguchi 2006). W obu eksperymentach β -kazomorfiny-5 w dawce (1 mg/kg, ip) stymulowała pamięć u zwierząt po wcześniejszym podaniu skopolaminy (1 mg/kg, sc), blokera acetylocholino, wywołującego upośledzenie zachowań spontanicznych i biernej reakcji unikania. Zdolność β -kazomorfiny-5 (1 mg/kg, ip) do konsolidacji pamięci została zahamowana poprzez podanie β -funaltreksaminy (antagonista receptorów μ -opiodowych, 0.1 μ g/zwierzę, icv), oraz naloksonazyny (antagonista receptorów μ_1 -opiodowych, 5 μ g/mouse, icv), co świadczyło o udziale receptorów μ w zahamowaniu zaburzeń pamięci i procesów uczenia się wynikających z upośledzenia szlaku cholinergicznego.

2.3 Działanie przeciwłękowe i przeciwdepresyjne

Wiadomo również, że układ opiodowy może być zaangażowany w regulację reakcji emocjonalnych, wpływa też na przebieg depresji czy zachowań lękowych. Sugerują to badania, w których związki wzmacniające neurotransmisję opiodową mogą wywierać rzeczywiste działanie przeciwdepresyjne (Jutkiewicz 2006). Duże nadzieje pokłada się w ligandach receptorów δ -opiodowych, odkąd badania z użyciem myszy ze znokautowanym genem receptora δ opiodowego wykazywały reakcje przypominające zachowania lękowe w teście podniesionego labiryntu krzyżowego i depresję w teście wymuszonego pływania (Filliol 2000).

Potencjalny efekt przeciwłękowy egzorfiny A5 obserwowany był w zwierzęcym modelu lęku, bazującym na naturalnej awersji gryzoni do eksplorowania podwyższonych i otwartych przestrzeni: w teście podniesionego labiryntu krzyżowego (elevated-plus maze) u myszy ddY. Peptyd wykazał działanie przeciwłękowe po podaniu doustnym w dawce 300 mg/kg. Zaobserwowano bowiem dwukrotne wydłużenie czasu spędzonego na otwartych ramionach labiryntu w porównaniu z grupą kontrolną (Takahashi 2000).

Podobnie peptydy uwalniane z β -konglicyniny soi, sojmorfina-5, -6, -7 działały przeciwłękowo po podaniu ip (min. skuteczna dawka 10 mg/kg) jak i po podaniu doustnym (min. skuteczna dawka 3 mg/kg). Co więcej peptydy te przy wyżej wymienionych dawkach nie wykazały aktywności przeciwbólowej (Ohinata i in. 2007).

Rubiskolina-6 wykazała efekt przeciwłękowy w dawce 10 mg/kg po podaniu ip, oraz w dawce 100 mg/kg po podaniu doustnym. Dodatkowo, nie zaobserwowano wpływu na aktywność lokomotoryczną, ponieważ nie uległa zmianie całkowita liczba wizyt na otwartych i zamkniętych ramionach labiryntu w obrębie 5 minut (Hirata i in. 2007). W celu zbadania mechanizmu leżącego u podstaw anksjolitycznego efektu rubiskolina-6 (10 mg/kg, ip lub 100 mg/kg, doustnie) podawana była z antagonistami: naltrindolem (1 mg/kg, sc), SCH23390 (antagonista receptora dopaminowego D1, 30 μ g/kg, ip), raklopridem (antagonista receptora dopaminowego D2, 15 μ g/kg, ip), BMY14802 lub BD1047 (antagoniści receptora σ_1 , odpowiednio 0.5 mg/kg lub 10 mg/kg, ip). Badania te wykazały, że pobudzenie receptora opiodowego δ przez rubiskolinę-6 indukuje aktywację mechanizmu zależnego od receptora σ_1 , co z kolei wzbudza uwalnianie dopaminy i stymulację receptora D1.

Działanie przeciwdepresyjne rubiskoliny-6 przebadano w teście behawioralnym na modelu zwierzęcym badającym zachowania depresyjne: w teście podwieszania za ogon (TST), a także w eksperymencie określającym spontaniczną aktywność lokomotoryczną (LMA) (Mitsumoto i in. 2019). W teście TST u zwierząt nie poddanych stresowi, rubiskolina-6 podana ip w dawce 30 mg/kg nie skróciła czasu bezruchu u myszy. Natomiast zastosowanie tej samej dawki, ale u myszy wystawionych na dodatkowy ostry stres, spowodowało zmniejszenie czasu nieruchomości. Efekt ten był antagonizowany przez receptory opioidowe δ , bowiem podanie naltrindolu (1 mg/kg, ip) zahamowało efekt przeciwdepresyjny peptydu. Rubiskolina-6 nie zmieniła znacząco aktywności lokomotorycznej zarówno u myszy poddanych jak i nie poddanych stresowi, co jest zgodne z innymi badaniami wykazującymi, że klasyczne leki przeciwdepresyjne nie wpływają lub tylko nieznacznie hamują aktywność motoryczną.

3. Podsumowanie

W tym artykule omówiono najbardziej znane endogenne peptydy pochodzące z białek żywności i opisano ich wpływ na układ nerwowy. Biorąc pod uwagę aktywność biologiczną scharakteryzowanych peptydów, ich właściwości przeciwbólowe, przeciwłękowe, przeciwdepresyjne, jak również wpływ na procesy zapamiętywania i uczenia się, wnioskować można, że są one atrakcyjnym oraz potencjalnym źródłem nowych terapii a także co ciekawe żywności funkcjonalnej. Jednak te efekty zależą od stabilności każdego z peptydu we krwi i zdolności do przekraczania bariery krew-mózg, co pozostaje kwestią nadal niedostatecznie zbadaną. Niemniej odkrycie bioaktywnych peptydów wzbudziło duże zainteresowanie i mogą być uważane jako związki wiodące do opracowania nutraceutyków.

4. Literatura

- Akil H, Owens C, Gutstein, H, et al. (1998) Endogenous opioids: Overview and current issues. *Drug and Alcohol Dependence*, 51(1–2), 127–140.
- Blass E, Blom J (1996) β -Casomorphin causes hypoalgesia in 10-day-old rats: Evidence for central mediation. *Pediatric Research*, 39(2), 199– 203.
- Brantl V, Teschemacher H, Bläsigg J, et al. (1981) Opioid activities of beta-casomorphins. *Life Sci.*;28(17):1903-9.
- Filliol D, Ghozland S, Chluba J, et al. (2000) Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet.*;25:195–200.
- Fukudome S, Jinsmaa Y, Matsukawa T, Sasaki R, Yoshikawa M, (1997) Release of opioid peptides, gluten exorphins by the action of pancreatic elastase. *FEBS Letters* 412 (3),475– 479.
- Fukudome S, Yoshikawa M, (1992) Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization. *FEBS Letters* 296 (1), 107–111.
- Hirata H, Sonoda S, Agui S, et al. (2007) Rubiscolin-6, a δ opioid peptide derived from spinach Rubisco, has anxiolytic effect via activating $\sigma 1$ and dopamine D1 receptors. *Peptides*, 28:1998-2003.
- Jutkiewicz EM (2006) The antidepressant-like effects of delta-opioid receptor agonists. *Molecular Interventions* 6, 162–169.
- Kitts D, Weiler K (2003) Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Curr Pharm Des.*, 9(16):1309-23.
- Lister J, Fletcher P, Nobrega J, et al. (2015) Behavioral effects of food-derived opioid-like peptides in rodents: Implications for schizophrenia? *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 134, 70–78.
- Malfacini D, Ambrosio C, Gro' MC, et. al. (2015) Pharmacological Profile of Nociceptin/Orphanin FQ Receptors Interacting with G-Proteins and β -Arrestins 2. *PLoS One*. 6;10(8).
- Mitsumoto Y, Sato R, Tagawa N, et. al. (2019) Rubiscolin-6, a δ -Opioid Peptide from Spinach RuBisCO, Exerts Antidepressant-Like Effect in Restraint-Stressed Mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, 65: 202-204.

- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, et al. (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett.*, 14;341(1):33-8.
- Ohinata K, Agui S, Yoshikawa M (2007) Soymorphins, Novel μ Opioid Peptides Derived from Soy β -Conglycinin β -Subunit, Have Anxiolytic Activities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71 (10), 2618–2621.
- Sakaguchi M, Koseki M, Wakamatsu M, et al. (2006) Effects of systemic administration of β -casomorphin-5 on learning and memory in mice. *Eur J Pharmacol.*13;530(1-2):81-7.
- Takahashi M, Fukunaga H, Kaneto H, et al. (2000) Behavioral and Pharmacological Studies on Gluten Exorphin A5, a Newly Isolated Bioactive Food Protein Fragment, in Mice. *Jpn J Pharmacol.*; 84(3):259-65.
- Villemagne P, Dannals R, Ravert H, et al.(2002) PET imaging of human cardiac opioid receptors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*,29(10):1385-8.
- Wittert G, Hope P, Pyle D (1996) Tissue Distribution of Opioid Receptor Gene Expression in the Rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 218, 877–881.
- Yang S, Kawamura Y, Yoshikawa M (2003) Effect of rubiscolin, a δ opioid peptide derived from Rubisco, on memory consolidation. *Peptides*, 24:325-328.
- Yang S, Yunden J, Sonoda S, et al. (2011) Rubiscolin, a δ -selective opioid peptide derived from plant Rubisco. *FEBS Lett.*, 509(2), 213-217.

15. Dualistyczna działalność wolnych rodników i charakterystyka wybranych antyoksydantów

Dualistic activity of free radicals and characteristics of selected antioxidants

Staśkiewicz Wiktoria⁽¹⁾, Jaruga-Sękowska Sylwia⁽²⁾, Piątek Małgorzata⁽³⁾, Białek-Dratwa Agnieszka⁽³⁾, Grajek Mateusz⁽⁴⁾, Karolina Sobczyk⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Zakład Technologii i Oceny Jakości Żywności, Katedra Dietetyki, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾ Zakład Promocji Zdrowia, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽³⁾ Zakład Żywienia Człowieka, Katedra Dietetyki, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽⁴⁾ Zakład Zdrowia Publicznego, Katedra Polityki Zdrowia Publicznego, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽⁵⁾ Zakład Ekonomiki i Zarządzania w Ochronie Zdrowia, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Elżbieta Grochowska-Niedworok

Staśkiewicz Wiktoria: wstaskiewicz@sum.edu.pl

Streszczenie

Do wolnych rodników zaliczamy reaktywne formy tlenu (RFT) oraz reaktywne formy azotu (RFA). W warunkach homeostazy wolne rodniki spełniają rolę mediatorów, jak również regulatorów w licznych procesach zachodzących w komórce. Reaktywne formy tlenu mają wpływ na starzenie komórek oraz decydują o ich śmierci lub przeżyciu. Szkodliwe działanie wolnych rodników przejawia się jako zdolność do utleniania struktur białkowych. Kwasy nukleinowe stanowią kolejną strukturę na którą RFT działają destrukcyjnie. Cechują się one jednak większą stabilnością w porównaniu z białkami. Peroksydacja lipidów stanowi kolejne niebezpieczne zjawisko związane z uszkodzeniami wywołanymi przez wolne rodniki. Destrukcyjnej działalności wolnych rodników przeciwdziałają liczne ochronne układy organizmu. System obronny zawiera wiele substancji pochodzenia endogennego oraz egzogenego. Związki endogenne organizm jest w stanie samodzielnie syntetyzować, związki egzogenne muszą być dostarczone do organizmu wraz z pożywieniem.

1. Wstęp

Wolnymi rodnikami nazywamy atomy lub cząsteczki, które mają zdolność do samodzielnej egzystencji, posiadające przynajmniej jeden atom tlenu oraz jeden bądź więcej niesparowanych elektronów. Liczne wolne rodniki powstają na skutek naturalnie zachodzących w organizmie procesów metabolicznych, tj. oddychanie tlenowe lub procesy zapalne (Kulik-Kupka i in. 2016).

2. Opis zagadnienia

Wolne rodniki to przede wszystkim reaktywne formy tlenu (RFT) oraz reaktywne formy azotu (RFA). Wolne rodniki tlenowe pochodzenia endogennego powstają podczas wewnątrzkomórkowego procesu oddychania, miejscem ich tworzenia są również komórki śródbłonna naczyń płuc, ponadto wytwarzane są przez eozynofile i neutrofile, monocyty, jak i makrofagi. Liczne reakcje biologiczne stanowią ich źródło, np. są naturalnym czynnikiem procesów detoksykacji w organizmie. Czynniki egzogenne mogą powodować ich nadmierne powstawanie, przykładem jest palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu oraz nieprawidłowa dieta. Wpływ zanieczyszczeń środowiskowych i przemysłowych, jak również działanie promieniowania jonizującego również przyczynia się do tworzenia znacznej ilości wolnych rodników. Przyspieszone tempo oddychania podczas wysiłku fizycznego także sprzyja wzmożonej produkcji wolnych rodników (Czajka 2006).

Do reaktywnych form tlenu zaliczamy między innymi: tlen singletowy, rodnik hydroksylowy, anionorodnik ponadtlenkowy oraz nadtlenek wodoru. Reaktywne formy azotu stanowią kolejną grupę związków charakteryzujących się wysoką reaktywnością chemiczną związaną z występowaniem na powłoce walencyjnej niesparowanych elektronów (Janicka i in. 2013).

Reakcje, w przebiegu których powstają wolne rodniki:

- a) homoliza,
- b) radioliza,
- c) fotoliza,
- d) sonoliza,
- e) jednoelektrodowe reakcje redoks (Wdowiak 2013).

Homoliza bazuje na rozpadzie cząsteczek posiadających słabe wiązania, w wyniku czego z dwóch elektronów tworzących wiązanie powstają dwa fragmenty posiadające po jednym elektronie (Wdowiak 2013).

Radioliza polega na rozbiciu cząsteczek pod wpływem działania promieniowania jonizującego (Świdarska-Kołacz i in. 2012). Fotoliza to rozpad cząsteczki związku chemicznego spowodowany absorpcją fotonu. Fotoliza cząsteczki wody skutkuje powstaniem wolnych elektronów, jonów wodorowych oraz cząsteczki tlenu. Rozpad cząsteczki pod wpływem ultradźwięków to sonoliza (Kłysz i Członkowska 2013).

Jednoelektrodowe reakcje redoks stanowią podstawową drogę tworzenia rodnika ponadtlenkowego w komórce. Liczne zredukowane formy związków niskocząsteczkowych reagują z tlenem i ulegają jednoelektrodowemu utlenianiu, skutkuje to tworzeniem anionorodnika ponadtlenkowego i wolnego rodnika (Wdowiak 2013).

3. Pozytywna działalność wolnych rodników w organizmie

W warunkach homeostazy wolne rodniki spełniają rolę mediatorów, jak również regulatorów w licznych procesach zachodzących w komórce. RFT inicjują apoptozę oraz różnicowanie się komórek, dodatkowo wzmagają przekazywanie glukozy do komórek. Zwiększają przepuszczalność kapilar, jest to niezbędne do poprawnego przebiegu reakcji zapalnych. Priorytetową funkcją reaktywnych form tlenu jest kontrola procesów bazujących na przekazywaniu sygnałów zarówno pomiędzy komórkami, jak również w ich obrębie (Zabłocka i Janusz 2008)

Komórki fagocytyczne posiadają zdolność do wykorzystania reaktywnych form tlenu w celu eliminacji czynników chorobotwórczych. Proces ten związany jest z nasilonym poborem tlenu i nosi miano „wybuchu tlenowego”. RFT biorą udział w eliminacji pasożytów oraz patogenów zasiedlających jamę ustną. Uczestniczą w regulacji procesów odpornościowych. Dodatkowo wzmagają aktywność limfocytów T oraz mają predyspozycje do wywołania adhezji komórek leukocytnych do śródbłonna, skutkuje to możliwością ich przeniknięcia z układu sercowo-naczyniowego w miejsce reakcji zapalnej (Kalisz i in. 2007).

Reaktywne formy tlenu mają wpływ na starzenie komórek oraz decydują o ich śmierci lub przeżyciu. Niskie stężenie RFT stymuluje elementy transkrypcyjne i nasila procesy różnicowania się oraz przystosowania komórek do zmienionych warunków. Wysokie stężenia reaktywnych form tlenu skutkują kierowaniem komórek na drogę apoptozy, dzięki temu możliwa jest eliminacja komórek o znacznym uszkodzeniu, w konsekwencji mogłyby one stanowić zagrożenie dla organizmu, przykładowo skutkować rozwojem choroby nowotworowej (Łuszczewski 2007), (Zabłocka i Janusz 2008).

4. Negatywna działalność wolnych rodników w organizmie

Szkodliwe działanie wolnych rodników przejawia się jako zdolność do utleniania struktur białkowych. Efektem kontaktu białek z reaktywnymi formami tlenu są nadtlenki białek. Ulegające uszkodzeniom białka są selektywnie eliminowane poprzez działanie proteaz, jednak wraz z postępującym starzeniem komórki aktywność proteolityczna ulega obniżeniu i uszkodzenia mogą ulec akumulacji. Kolejnym skutkiem negatywnego działania na białka jest rozerwanie łańcucha polipeptydowego, tworzenie innych reszt aminokwasowych oraz powstanie dimerów, agregatów

białkowych. Zmiany te w efekcie skutkują utratą aktywności enzymów, błonowych transporterów oraz białek regulatorowych (Zabłocka i Janusz 2008).

Kwasy nukleinowe stanowią kolejną strukturę na którą RFT działają destrukcyjnie. Cechują się one jednak większą stabilnością w porównaniu z białkami. Wolne rodniki w interakcji z kwasami nukleinowymi mogą powodować uszkodzenie zasad pirymidynowych i purynowych, jak również reszt cukrowych, mogą wpływać na rozerwanie wiązań fosfodiesterowych łączących nukleotydy. Efektem tej działalności jest pęknięcie nici kwasów nukleinowych. Ponadto, w związku z bliskim sąsiedztwem mitochondrialnego łańcucha oddechowego mitochondrialny DNA jest w większym stopniu narażony na destrukcję związane z oksydacją (Piotrowska i Bartnik 2014).

Peroksydacja lipidów stanowi kolejne niebezpieczne zjawisko związane z uszkodzeniami wywołanymi przez wolne rodniki. Peroksydacja lipidów polega na ich wolnorodnikowym utlenianiu, dzieli się na trzy fazy: inicjacji, propagacji oraz terminacji. Faza pierwsza – inicjacja – polega na odłączeniu od nienasyconego kwasu tłuszczowego, który buduje fosfolipidy cząsteczki wodoru. Może być zapoczątkowana przez rodniki nadtlenkowe, hydroksylowe, alkilowe oraz dwutlenek azotu i tlenek azotu. Faza druga – propagacja (prolongacja) – opiera się na reakcji wolnych rodników alkilowych z tlenem, tworzą się wolne rodniki nadtlenkowe, a w następstwie nadtlenek kwasu tłuszczowego. Reakcja ta może przebiegać wielokrotnie i skutkować przemianą wielu cząsteczek kwasów tłuszczowych. Ostatnia faza, czyli terminacja może zachodzić pomiędzy dwoma rodnikami znajdującymi się w układzie. Skutkiem tej fazy jest tworzenie uszkodzonych cząsteczek lipidów. Podczas peroksydacji lipidów mogą powstawać wolne rodniki, zdolne do reakcji z białkami, w wyniku czego powstają wolne rodniki białek. Produkty, które powstały podczas reakcji peroksydacji lipidów wpływają na modyfikację właściwości fizycznych błon komórkowych, przykładem jest zahamowanie aktywności enzymów błonowych i białek transportujących (Ścibor-Bentkowska i Cieczot 2009)

5. Charakterystyka wybranych antyoksydantów

Destrukcyjnej działalności wolnych rodników przeciwdziałają liczne ochronne układy organizmu. System obronny zawiera wiele substancji pochodzenia endogennego oraz egzogenego. Związki endogenne organizm jest w stanie samodzielnie syntetyzować, związki egzogenne muszą być dostarczone do organizmu wraz z pożywieniem (Wielkoszyński i in. 2007).

6. Antyoksydanty endogenne

Syntetyzowane przez organizm związki o charakterze antyoksydacyjnym to: zredukowany glutation (GSH) oraz enzymy: dysmutaza nadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx), reduktaza (GR) oraz transferaza (GST). Wszystkie wymienione enzymy są metaloproteinami i zawierają w swoich centrach aktywnych jony metali, zaliczane są do klasy oksydoreduktaz. Katalaza wraz z peroksydazą glutationową i dysmutazą nadtlenkową tworzą swoisty, zintegrowany system antyoksydacyjny, określany jako triada oksydacyjna (Urbański i in. 2013).

Obrona organizmu przed szkodliwym działaniem RFT dzieli się na trzy bazowe systemy:

- Pierwsza linia obrony – zapobieganie powstawaniu rodnika wodorotlenowego, tworzą ją takie enzymy jak dysmutaza nadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) i peroksydaza glutationowa (GPx).
- Druga linia obrony – kierowanie wolnorodnikowych reakcji na drogę terminacji, największe znaczenie spełniają tu antyoksydanty małocząsteczkowe.
- Trzecia linia obrony – naprawa uszkodzeń powstałych w wyniku działania wolnych rodników, stanowią ją enzymy antyoksydacyjne minimalizujące ilość produktów powstałych w wyniku peroksydacji lipidów lub uszkodzeniu DNA (Skólmowska i Kmieć 2011)

Potencjał przeciwutleniający organizmu uwarunkowany jest ponadto obecnością i działaniem białek posiadających cechy antyoksydacyjne. Antyoksydanty prewencyjne zapobiegają powstawaniu nowych reaktywnych form tlenu i przeciwdziałają peroksydacji lipidów. W osoczu tą

funkcję spełniają: albumina, ferrytyna, ceruloplazmina, transferyna, białka te wiążą się z jonami metali przejściowych, np. żelazem lub miedzią, które posiadają w swojej strukturze niesparowane elektrony i tworzą ochronę przed reakcjami utleniającymi. Badania „in vitro” wykazują ochronne działanie albuminy względem erytrocytów przed peroksydacją powstałą przez jony miedzi, poprzez ich wiązanie. Zapobiega to tworzeniu rodnika hydroksylowego z nadtlenku wodoru. Proteiny wiążące żelazo, czyli ferrytyna i transferyna uniemożliwiają pozabiałkowemu gromadzeniu jonów żelaza, tymczasem ceruloplazmina bierze udział w transformacji anionorodnika ponadtlenkowego i utlenianiu jonów żelaza. Właściwości przeciwutleniające posiada również kwas moczowy, łączy on jony metali oraz wychwytuje rodnik hydroksylowy. Badania dowodzą, iż białka i kwas moczowy wzajemnie się dopełniają w pełnieniu funkcji antyoksydacyjnej (Zabłocka i Janusz 2008).

7. Antyoksydanty egzogenne

Ważny aspektem ochrony organizmu są związki o charakterze przeciwutleniającym dostarczane do organizmu wraz z pożywieniem, czyli związki egzogenne. Przykładem takich związków są: retinol, α -tokoferol, kwas askorbinowy, karotenoidy, egzogenne koenzym Q_{10} , polifenole. Wymienione związki mają wielokierunkowe działanie, mogą działać jako substancje redukujące, jako związki blokujące wolne rodniki, są zdolne do tworzenia kompleksów z metalami, które biorą udział w reakcjach utleniania, hamują działanie enzymów utleniających (Gryszczyńska i Iskra 2008).

Retinol jest związkiem rozpuszczalnym w tłuszczach, pełni zasadniczą rolę w pracy komórki, jak również całego organizmu. Najważniejsze postaci to retinol oraz 3-4-didehydroretinol. Retinol w organizmie magazynowany jest głównie w tkance tłuszczowej i wątrobie, produktami będącymi jego źródłem są przede wszystkim warzywa i owoce bogate w karotenoidy, częściowo posiadające charakter prowitaminy A. Przykładem jest β -karoten, pod działaniem dioksygenazy β -karotenowej wyzwala 2 cząsteczki retinalu. Potencjał przeciwutleniający witaminy A wiele razy został potwierdzony badaniami „in vitro” oraz „in vivo”. Związek ten wchodzi w reakcje z rodnikami nadtlenkowymi, skutkuje to zahamowaniem łańcuchowej reakcji peroksydacji lipidów i tworzenia wodoronadtlenków, dodatkowo bezpośrednio wchodzi w reakcje z RFT. Karotenoidy również mają wielokierunkowe działanie antyoksydacyjne, skutecznie eliminują tlen singletowy oraz mają zdolność zmiatania wolnych rodników nadtlenkowych. Dzięki zawartości w swojej strukturze łańcucha polienowego zawierającego liczne wiązania podwójne, związek ten może brać udział w reakcjach redoks (Szymańska-Pasternak 2011).

Witamina E jest kolejnym istotnym przeciwutleniaczem, podobnie jak retinol jest związkiem rozpuszczalnym w tłuszczach. Wyróżnia się 8 postaci tokoferolu, zawierają w swojej strukturze układ pierścieniowy 6-chromanolu oraz szesnastowęglowy łańcuch boczny. Tokoferol posiada wszystkie wiązania nasycone w łańcuchu bocznym, tokotrienol posiada trzy wiązania podwójne. Dzięki obecności w budowie hydrofobowego łańcucha bocznego tokoferol może być wbudowany w błony biologiczne. Działanie tokoferoli jest dobrze udowodnione, między innymi predyspozycja do zakłócania łańcuchowej peroksydacji lipidów. Wchodzi w reakcję z wytwarzanymi w błonach biologicznych i lipoproteinach rodnikami nadtlenkowymi i tworzą rodniki tokoferylowe. Mało reaktywny rodnik tokoferylowy może wejść w reakcje z kolejnym wolnym rodnikiem lub ulec redukcji pod wpływem działania innych związków o charakterze oksydoredukcyjnym. Wybitnie istotna jest obecność tokoferolu w strukturach komórkowych zawierających duże ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, np. błony komórkowe i otoczki mielinowe neuronów, jak również w strukturach narażonych na duże nasycenie tlenu, np. błony komórek dróg oddechowych i erytrocytów (Guz i in. 2005).

Kwas askorbinowy obecny jest w płynach ustrojowych prawie całkowicie zdysocjowany w formie anionu askorbinowego. Ważną cechą witaminy C jest zdolność redukująca. W reakcji z czynnikiem utleniającym askorbinian w wyniku jednoelektronowej redukcji jest zdolny do generowania wolnego rodnika askorbylowego, będącego cząsteczką o małej reaktywności. Wolne rodniki cechujące się dużą reaktywnością reagują z askorbinianem, skutkuje to utlenianiem rodnika askorbylowego i powstaniem nietrwałego kwasu dehydroaskorbinowego rozpadającego się na kwas szczawiowy i kwas treozowy. Swoje właściwości antyoksydacyjne witamina C zawdzięcza swoim

właściwościom redukującym, bierze również udział w przywracaniu antyoksydacyjnych właściwości związkom takim jak β -karoten i α -tokoferol z formy rodnikowej. Badania dowodzą, iż askorbinian ma właściwości przeciwutleniające zabezpieczające frakcje lipidowe krwi LDL oraz błony biologiczne przed szkodliwym działaniem wolnych rodników (Szymańska-Pasternak 2011).

Karotenoidy to grupa pigmentów żółtych, czerwonych oraz pomarańczowych, która występuje powszechnie w tkankach roślinnych. Należą do związków hydrofobowych, są nierozpuszczalne w wodzie, w krwi związane są z lipoproteinami. Zlokalizowane są w błonach komórkowych, tkance tłuszczowej oraz mają zdolność do wiązania się z pewnymi białkami. Związki należące do tej grupy to: α -karoten, β -karoten oraz likopen. Karotenoidy są prekursorem witaminy A i są bazowym źródłem witaminy w diecie. Badania „in vitro” dowiodły, że podczas małego stężenia tlenu β -karoten hamuje peroksydację lipidów, jednakże przy dużym stężeniu ma ograniczone działanie. Dodatkowo bierze udział w zmiataniu wolnych rodników (Sroka i in. 2005).

Koenzym Q10 występuje w organizmie w dwóch formach: utlenionej – ubichinon oraz zredukowanej – ubichinol. Działanie przeciwutleniające przejawia forma zredukowana, dzięki czemu hamuje destrukcyjne działanie, np. modyfikację oksydacyjną białek oraz DNA i peroksydację lipidów. Dodatkowo ma wpływ na regenerację α -tokoferolu. Ubichinol ma bezpośrednie działanie przeciwutleniające, które polega na wiązaniu wolnych rodników, zapobiega to w konsekwencji peroksydacji lipidów i zmianom właściwości białek oraz DNA wywołanych oksydacją (Siemieniuk 2005).

Rozległą grupę związków przeciwutleniających stanowią polifenole, czyli związki zawierające co najmniej jedną grupę hydroksylową związaną pierścieniem aromatycznym. Do polifenoli zaliczyć można: kwasy polifenolowe, flawonoidy, stilbeny, lignany. Zdolność antyoksydacyjna zależy jest zarówno od liczby, jak również położenia grup hydroksylowych. Związki te hamują tworzenie anionorodnika ponadtlenkowego, zmniejszają powstawanie rodnika hydroksylowego, zmiatają wolne rodniki np. anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik wodoronadtlenkowy, hydroksylowy, nadtlenny, jak również neutralizują tlen singletowy. Ich wielokierunkowe działanie przeciwutleniające przerywa lawinowe reakcje wolnorodnikowe prowadzące do peroksydacji lipidów. Dodatkowo wpływają na odnowę utlenionych form antyoksydantów niskocząsteczkowych, np. β -karotenu, askorbinianu, α -tokoferolu (Majewska, Czczot 2009).

Enzymy antyoksydacyjne w swojej budowie zawierają niektóre pierwiastki, np. cynk, miedź lub selen, w związku z tym występuje zależność między aktywnością enzymów antyoksydacyjnych, a dostarczeniem tych mikroelementów wraz z dietą (Siemieniuk 2005).

Cynk wpływa na utrzymanie struktury dysmutazy ponadtlenkowej, dzięki czemu wytwarzanie RFT ulega redukcji, ponadto zapobiega stratom witaminy E, ma wpływ na utrzymanie melatoniny na właściwym poziomie, stabilizuje struktury błony komórkowej. Miedź jest składnikiem dysmutazy ponadtlenkowej i chroni komórki przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu. Istnieją białka wiążące jeden atom miedzi i cynku mające działanie zbliżone do SOD, są zmiataczami wolnych rodników. Zalicza się do nich: hepatokupreina zlokalizowana w wątrobie, cerebropupreina występująca w mózgu i erytokupreina w erytrocytach. Kolejnym kluczowym dla funkcjonowania organizmu pierwiastkiem jest selen. Większość aktywnie biologicznego selenu znajduje się pod postacią selenoaminokwasów – selenometioniny i selenocysteiny, wbudowane są w strukturę białek. Selenocysteina buduje białka enzymatyczne, tj. peroksydazę glutationową. Zapotrzebowanie na selen pod wpływem witaminy E zwiększa się, ponieważ utrzymuje go w aktywnej postaci i chroni selenobiałka przed oksydacją (Brzozowski i Bojar 2014).

Kreatyna jest substancją naturalnie występującą w komórkach mięśniowych człowieka. Jest syntetyzowana z aminokwasów: glicyny, argininy i metioniny w trzustce, wątrobie oraz nerkach, jak również w niewielkich ilościach w mózgu i jądrach. Zawartość związku w organizmie wynosi 120-140 gramów, aż 95-98% kreatyny zlokalizowanej jest w komórkach mięśniowych w dwóch formach: wolna kreatyna stanowi 30-40% oraz fosforan kreatyny 60-75%. Po związaniu kreatyny z resztą kwasu fosforowego przyjmuje ona postać fosforanu i jest źródłem energii. Energia ta może zostać zużytkowana jako substrat energetyczny dla mózgu, w mięśniach występuje 3-4 razy więcej fosforanu kreatyny niż adenozyntrofosforanu. Główną funkcją jest dostarczenie energii do odbudowy

zużytych cząsteczek ATP będących pierwszorzędym źródłem energii w czasie skurczu mięśni. Kreatyna jest związkiem występującym w codziennej diecie, źródłem jest czerwone mięso, śledzie, tuńczyk, wieprzowina, mleko. W literaturze zaznacza się antyoksydacyjne właściwości kreatyny, przykładowo na komórki mózgowe. Suplementacja kreatyną korzystnie wpłynęła na całkowity potencjał oksydacyjny osób mających przewlekłe choroby nerek (Szewczyk 2015).

Karnozyna to naturalnie występujący związek imidazolowy, jej obecność wykazano w licznych narządach, jednak w większej ilości występuje w mięśniach szkieletowych. Udowodniono, że hamuje rozkład wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, np. lecytyny i kwasu linolowego, które są wrażliwe na działanie RFT. Uszkodzenia oksydacyjne tych kwasów zaburzają strukturę błon komórkowych, jak również przemianę cholesterolu, przewodzenie impulsów nerwowych oraz agregację płytek krwi. Karnozyna wpływa na zmniejszenie ilości jednego z produktów peroksydacji lipidów, który jest odpowiedzialny za propagację w komórce uszkodzeń oksydacyjnych lipidów oraz innych struktur takich jak białka, cukry i kwasy nukleinowe. Dodatkowo chroni komórki przed destrukcyjnym działaniem oksydantów poprzez wiązanie jonów miedzi i przerywanie reakcji Fentona, która generuje jeden z najbardziej aktywnych rodników – hydroksylowy. Warto podkreślić, że związek ten nie bierze udziału w bezpośredniej redukcji RFT, w przeciwieństwie do innych przeciwutleniaczy, np. tokoferoli, kwasu askorbinowego i związków tiolowych. Karnozyna ma wpływ na poziom RFT, jednak nie hamuje całkowicie funkcji regulatorowych oraz sygnalizacyjnych (Szewczyk 2015).

L-karnityna jest substancją wytwarzaną w organizmie i tylko częściowo dostarczać należy ją z diety. Syntetyzowana jest w wątrobie, nerkach i mózgu. L-karnityna transportuje kwasy tłuszczowe o długich łańcuchach do organelli jakimi są mitochondria. Kwasy tłuszczowe ulegają przemianom, w wyniku których wytwarzana jest energia niezbędna do prawidłowego funkcjonowania komórek. Pełni ona w tym procesie rolę transportera hydrofobowych kwasów tłuszczowych przez nieprzepuszczalną dla takich związków błonę mitochondrialną. L-karnitynie przypisuje się udział w drugiej linii obrony antyoksydacyjnej – przerywanie kaskadowych reakcji wolnorodnikowych i destrukcyjnych reakcji utleniania. Zmniejsza liczbę uszkodzeń powstałych w wyniku utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, wchodzi w skład fosfolipidów błonowych, jest bardzo ważnym elementem stabilizacji błon komórkowych. Jej antyoksydacyjne działanie potwierdza zdolność do obniżania akumulacji lipofuscyny, związek ten jest markerem procesu peroksydacji lipidów w komórkach organizmu. Mechanizm jej działania wskazuje, iż może ochraniać błony erytrocytów, jak również naczynia krwionośne i dzięki temu zapobiega tworzeniu w nich zmian miażdżycowych (Czeczot i Ścibor 2005).

8. Podsumowanie

Reaktywne formy tlenu pełnią wiele pozytywnych oraz negatywnych funkcji w organizmie człowieka. Zarówno ich nadmierna produkcja, jak również neutralizacja może przyczynić się do zachodzenia patologicznych zjawisk m. in do rozwoju schorzeń związanych z występowaniem stresu oksydacyjnego. Wpływ wolnych rodników na komórki w znacznym stopniu zależy od czasu działania oraz ich stężenia. Funkcje fizjologiczne spełniają niewielkie stężenia wolnych rodników, znaczne prowadzą do destrukcji struktur komórkowych, co w konsekwencji prowadzi do ich zniszczenia (Łuszczewski 2007).

9. Literatura

- Czajka A (2006) Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu. *Nowiny Lekarskie* 6: 582-586.
- Czeczot H, Ścibor D (2005) Rola L-karnityny w przemianach, żywieniu i terapii. *Postepy Hig Med Dosw* 59: 9-19.
- Guz J, Dziaman T, Szpila A (2007) Czy witaminy antyoksydacyjne mają wpływ na proces karcynogenezy? *Postepy Hig Med Dosw* 61: 185-198.
- Gryszczyńska B, Iskra M (2008) Współdziałanie antyoksydantów egzogennych i endogennych. *Nowiny Lekarskie* 77(1): 50-55.

- Janicka A, Szymańska-Pasternak J, Bober J (2013) Polimorfizm genów obrony antyoksydacyjnej a ryzyko rozwoju raka. *Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie* 2: 18-28.
- Kalisz O, Wolski T, Gerkowicz M i in. (2007) Reaktywne formy tlenu (RFT) oraz ich rola w patogenezie niektórych chorób. *Annales* 62(1): 87-99.
- Kłysz B, Członkowska A (2013) Związki o działaniu antyoksydacyjnym w leczeniu udaru niedokrwiennego mózgu – nadzieje na przyszłość. *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii* 3(4): 159-167.
- Kulik-Kupka K, Nowak J, Koszowska A i in. (2016) Witaminy w walce z nowotworami. *Med Rodz* 1(19): 26-31.
- Łuszczewski A, Matyska-Piekarska E, Trefler J i in. (2007) Reaktywne formy tlenu – znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu. *Reumatologia* 5: 284-289.
- Urbański K, Nowak M, Guzik T (2013) Wpływ stresu oksydacyjnego na funkcjonowanie naczyń krwionośnych. *Postępy Biochemii* 59(4): 424-431.
- Piotrowska A, Bartnik E (2014) Rola reaktywnych form tlenu i mitochondriów w starzeniu. *Postępy Biochemii* 60(2): 240-247.
- Siemienuk E, Skrzydlewska E (2005) Koenzym Q10 – biosynteza i znaczenie biologiczne w organizmach zwierząt i człowieka. *Postępy Hig Med Dosw* 59: 150-159.
- Skólmowska M, Kmiec M (2011) Enzymosomy antyoksydacyjne – właściwości i zastosowanie. *Postępy Hig Med Dosw* 65: 640-644.
- Szewczyk P, Poniewierka E (2015) Kreatyna – zastosowanie w sporcie i medycynie. *Piel Zdr Publ* 5(4): 409-416.
- Szymańska-Pasternak J, Janicka A, Bober J (2011) Witamina C jako oręż w walce z rakiem. *Via Medica* 7(1): 9-23.
- Ścibor-Bentkowska D, Czeczot H (2009) Komórki nowotworowe a stres oksydacyjny. *Postępy Hig Med Dosw* 63:58-72.
- Świdarska-Kończak, Kumański K, Parka B (2012) Alkohol a stres oksydacyjny. *Kosmos* 1(294): 93-103.
- Wdowiak A (2013) Rola dysmutazy nadtlenkowej i wolnych rodników w zaburzeniach płodności męskiej. *EJMT* 1(1): 53-59.
- Wielkoszyński T, Zawadzki M, Lebek-Ordon A i in. (2007) Enzymatyczne układy antyoksydacyjne – właściwości, występowanie i rola biologiczna. *Diagn Lab* 43: 283-294.
- Zabłocka A, Janusz M (2008) Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Postępy Hig Med Dosw* 62: 118-124.

16. Charakterystyka wybranych antyoksydantów egzogenych i endogenych oraz ich źródła

Characteristics of selected exogenous and endogenous antioxidants and their sources

Staśkiewicz Wiktoria⁽¹⁾, Jaruga-Sękowska Sylwia⁽²⁾, Piątek Małgorzata⁽³⁾, Białek-Dratwa Agnieszka⁽³⁾, Grajek Mateusz⁽⁴⁾, Karolina Sobczyk⁽⁵⁾

⁽¹⁾ Zakład Technologii i Oceny Jakości Żywności, Katedra Dietetyki, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾ Zakład Promocji Zdrowia, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽³⁾ Zakład Żywienia Człowieka, Katedra Dietetyki, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽⁴⁾ Zakład Zdrowia Publicznego, Katedra Polityki Zdrowia Publicznego, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽⁵⁾ Zakład Ekonomiki i Zarządzania w Ochronie Zdrowia, Wydział Nauk o Zdrowiu w Bytomiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Elżbieta Grochowska-Niedworok

Staśkiewicz Wiktoria: wstaskiewicz@sum.edu.pl

Streszczenie

Szkodliwej aktywności wolnych rodników przeciwdziałają związki antyoksydacyjne, zarówno endogenne, jak również egzogenne. Do związków endogennych zaliczmy: dysmutaza nadadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx), reduktaza (GR) oraz transferaza (GST). Istotnym aspektem ochrony organizmu są antyoksydanty dostarczane do organizmu wraz z pożywieniem, czyli związki egzogenne. Przykładem takich związków są: retinol, α -tokoferol, kwas askorbinowy, karotenoidy, egzogeny koenzym Q₁₀, polifenole. Do produktów bogatych w te substancje możemy zaliczyć owoce, warzywa, suche nasion roślin strączkowych, tłuszcze, herbata, zioła i przyprawy.

1. Wstęp

Destrukcyjnej działalności wolnych rodników przeciwdziałają liczne ochronne układy organizmu. System obronny zawiera wiele substancji pochodzenia endogennego oraz egzogenego. Związki endogenne organizm jest w stanie samodzielnie syntetyzować, związki egzogenne muszą być dostarczone do organizmu wraz z pożywieniem (Wielkoszyński i in. 2007).

2. Opis zagadnienia

2.1 Antyoksydanty endogenne

Syntetyzowane przez organizm związki o charakterze antyoksydacyjnym to: zredukowany glutation (GSH) oraz enzymy: dysmutaza nadadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx), reduktaza (GR) oraz transferaza (GST). Wszystkie wymienione enzymy są metaloproteinami i zawierają w swoich centrach aktywnych jony metali, zaliczane są do klasy oksydoreduktaz. Katalaza wraz z peroksydazą glutationową i dysmutazą nadadtlenkową tworzą swoisty, zintegrowany system antyoksydacyjny, określany jako triada oksydacyjna (Urbański i in. 2013).

Obrona organizmu przed szkodliwym działaniem RFT dzieli się na trzy bazowe systemy:

- Pierwsza linia obrony – zapobieganie powstawaniu rodnika wodorotlenowego, tworzą ją takie enzymy jak dysmutaza nadadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) i peroksydaza glutationowa (GPx).

- Druga linia obrony – kierowanie wolnorodnikowych reakcji na drogę terminacji, największe znaczenie spełniają tu antyoksydanty małowcząsteczkowe.
- Trzecia linia obrony – naprawa uszkodzeń powstałych w wyniku działania wolnych rodników, stanowią ją enzymy antyoksydacyjne minimalizujące ilość produktów powstałych w wyniku peroksydacji lipidów lub uszkodzeniu DNA (Skólmowska i Kmiec 2011)

Potencjał przeciwutleniający organizmu uwarunkowany jest ponadto obecnością i działaniem białek posiadających cechy antyoksydacyjne. Antyoksydanty prewencyjne zapobiegają powstawaniu nowych reaktywnych form tlenu i przeciwdziałają peroksydacji lipidów. W osoczu tą funkcję spełniają: albumina, ferrytyna, ceruloplazmina, transferyna, białka te wiążą się z jonami metali przejściowych, np. żelazem lub miedzią, które posiadają w swojej strukturze niesparowane elektrony i tworzą ochronę przed reakcjami utleniającymi. Badania „in vitro” wykazują ochronne działanie albuminy względem erytrocytów przed peroksydacją powstałą przez jony miedzi, poprzez ich wiązanie. Zapobiega to tworzeniu rodnika hydroksylowego z nadtlenu wodoru. Proteiny wiążące żelazo, czyli ferrytyna i transferyna uniemożliwiają pozabiałkowemu gromadzeniu jonów żelaza, tymczasem ceruloplazmina bierze udział w transformacji anionorodnika ponadtlenkowego i utlenianiu jonów żelaza. Właściwości przeciwutleniające posiada również kwas moczowy, łączy on jony metali oraz wychwytuje rodnik hydroksylowy. Badania dowodzą, iż białka i kwas moczowy wzajemnie się dopełniają w pełnieniu funkcji antyoksydacyjnej (Zabłocka i Janusz 2008)

2.2 Antyoksydanty egzogenne

Ważny aspektem ochrony organizmu są związki o charakterze przeciwutleniającym dostarczane do organizmu wraz z pożywieniem, czyli związki egzogenne. Przykładem takich związków są: retinol, α - tokoferol, kwas askorbinowy, karotenoidy, egzogenne koenzym Q₁₀, polifenole. Wymienione związki mają wielokierunkowe działanie, mogą działać jako substancje redukujące, jako związki blokujące wolne rodniki, są zdolne do tworzenia kompleksów z metalami, które biorą udział w reakcjach utleniania, hamują działanie enzymów utleniających (Wawrzyniak i in. 2011).

Retinol jest związkiem rozpuszczalnym w tłuszczach, pełni zasadniczą rolę w pracy komórki, jak również całego organizmu. Najważniejsze postaci to retinol oraz 3-4-didehydroretinol. Retinol w organizmie magazynowany jest głównie w tkance tłuszczowej i wątrobie, produktami będącymi jego źródłem są przede wszystkim warzywa i owoce bogate w karotenoidy, częściowo posiadające charakter prowitamiны A. Przykładem jest β -karoten, pod działaniem dioksygenazy β -karotenowej wyzwala 2 cząsteczki retinalu. Potencjał przeciwutleniający witamiны A wiele razy został potwierdzony badaniami „in vitro” oraz „in vivo”. Związek ten wchodzi w reakcje z rodnikami nadtlenkowymi, skutkuje to zahamowaniem łańcuchowej reakcji peroksydacji lipidów i tworzenia wodoronadtlenków, dodatkowo bezpośrednio wchodzi w reakcje z RFT. Karotenoidy również mają wielokierunkowe działanie antyoksydacyjne, skutecznie eliminują tlen singletowy oraz mają zdolność zmiatania wolnych rodników nadtlenkowych. Dzięki zawartości w swojej strukturze łańcucha polienowego zawierającego liczne wiązania podwójne, związek ten może brać udział w reakcjach redoks (Sroka i in. 2005).

Witamina E jest kolejnym istotnym przeciwutleniaczem, podobnie jak retinol jest związkiem rozpuszczalnym w tłuszczach. Wyróżnia się 8 postaci tokoferolu, zawierają w swojej strukturze układ pierścieniowy 6-chromanolu oraz szesnastowęglowy łańcuch boczny. Tokoferol posiada wszystkie wiązania nasycone w łańcuchu bocznym, tokotrienol posiada trzy wiązania podwójne. Dzięki obecności w budowie hydrofobowego łańcucha bocznego tokoferol może być wbudowany w błony biologiczne (Guz i in. A 2007). Działanie tokoferoli jest dobrze udowodnione, między innymi predyspozycja do zakłócania łańcuchowej peroksydacji lipidów. Wchodzi w reakcję z wytwarzanymi w błonach biologicznych i lipoproteinach rodnikami nadtlenkowymi i tworzą rodniki tokoferylowe. Mało reaktywny rodnik tokoferylowy może wejść w reakcje z kolejnym wolnym rodnikiem lub ulec redukcji pod wpływem działania innych związków o charakterze oksydoredukcyjnym. Wybitnie istotna jest obecność tokoferolu w strukturach komórkowych zawierających duże ilości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, np. błony komórkowe i otoczki mielinowe neuronów,

jak również w strukturach narażonych na duże nasycenie tlenu, np. błony komórek dróg oddechowych i erytrocytów (Dudkowska i Kucharewicz 2014).

Kwas askorbinowy obecny jest w płynach ustrojowych prawie całkowicie zdysocjowany w formie anionu askorbinowego. Ważną cechą witaminy C jest zdolność redukująca. W reakcji z czynnikiem utleniającym askorbinian w wyniku jednoelektronowej redukcji jest zdolny do generowania wolnego rodnika askorbylowego, będącego cząsteczką o małej reaktywności. Wolne rodniki cechujące się dużą reaktywnością reagują z askorbinianem, skutkuje to utlenianiem rodnika askorbylowego i powstaniem nietrwałego kwasu dehydroaskorbinowego rozpadającego się na kwas szczawiowy i kwas treozowy. Swoje właściwości antyoksydacyjne witamina C zawdzięcza swoim właściwościom redukującym, bierze również udział w przywracaniu antyoksydacyjnych właściwości związkom takim jak β -karoten i α -tokoferol z formy rodnikowej. Badania dowodzą, iż askorbinian ma właściwości przeciwutleniające zabezpieczające frakcje lipidowe krwi LDL oraz błony biologiczne przed szkodliwym działaniem wolnych rodników (Szymańska-Pasternak i in. 2011).

Karotenoidy to grupa pigmentów żółtych, czerwonych oraz pomarańczowych, która występuje powszechnie w tkankach roślinnych. Należą do związków hydrofobowych, są nierozpuszczalne w wodzie, we krwi związane są z lipoproteinami. Zlokalizowane są w błonach komórkowych, tkance tłuszczowej oraz mają zdolność do wiązania się z pewnymi białkami. Związki należące do tej grupy to: α -karoten, β -karoten oraz likopen. Karotenoidy są prekursorem witaminy A i są bazowym źródłem witaminy w diecie. Badania „in vitro” dowiodły, że podczas małego stężenia tlenu β -karoten hamuje peroksydację lipidów, jednakże przy dużym stężeniu ma ograniczone działanie. Dodatkowo bierze udział w zmiataniu wolnych rodników (Sroka i in. 2005).

Koenzym Q10 występuje w organizmie w dwóch formach: utlenionej – ubichinon oraz zredukowanej – ubichinol. Działanie przeciwutleniające przejawia forma zredukowana, dzięki czemu hamuje destrukcyjne działanie, np. modyfikację oksydacyjną białek oraz DNA i peroksydację lipidów. Dodatkowo ma wpływ na regenerację α -tokoferolu. Ubichinol ma bezpośrednie działanie przeciwutleniające, które polega na wiązaniu wolnych rodników, zapobiega to w konsekwencji peroksydacji lipidów i zmianom właściwości białek oraz DNA wywołanych oksydacją (Miktus 2006).

Rozległą grupę związków przeciwutleniających stanowią polifenole, czyli związki zawierające co najmniej jedną grupę hydroksylową związaną pierścieniem aromatycznym. Do polifenoli zaliczyć można: kwasy polifenolowe, flawonoidy, stilbeny, lignany. Zdolność antyoksydacyjna zależna jest zarówno od liczby, jak również położenia grup hydroksylowych. Związki te hamują tworzenie anionrodnika ponadtlenkowego, zmniejszają powstawanie rodnika hydroksylowego, zmiatają wolne rodniki np. anionrodnik ponadtlenkowy, rodnik wodoronadtlenkowy, hydroksylowy, nadtlenkowy, jak również neutralizują tlen singletowy. Ich wielokierunkowe działanie przeciwutleniające przerywa lawinowe reakcje wolnorodnikowe prowadzące do peroksydacji lipidów. Dodatkowo wpływają na odnowę utlenionych form antyoksydantów niskocząsteczkowych, np. β -karotenu, askorbinianu, α -tokoferolu (Majewska i Czeczot 2009).

Enzymy antyoksydacyjne w swojej budowie zawierają niektóre pierwiastki, np. cynk, miedź lub selen, w związku z tym występuje zależność między aktywnością enzymów antyoksydacyjnych, a dostarczeniem tych mikroelementów wraz z dietą (Wdowiak i Wdowiak 2013).

Cynk wpływa na utrzymanie struktury dysmutazy ponadtlenkowej, dzięki czemu wytwarzanie RFT ulega redukcji, ponadto zapobiega stratom witaminy E, ma wpływ na utrzymanie melatoniny na właściwym poziomie, stabilizuje strukturę błony komórkowej. Miedź jest składnikiem dysmutazy ponadtlenkowej i chroni komórki przed szkodliwym działaniem reaktywnych form tlenu. Istnieją białka wiążące jeden atom miedzi i cynku mające działanie zbliżone do SOD, są zmiataczami wolnych rodników. Zalicza się do nich: hepatokupreina zlokalizowana w wątrobie, cerebropupreina występująca w mózgu i erytropupreina w erytrocytach. Kolejnym kluczowym dla funkcjonowania organizmu pierwiastkiem jest selen. Większość aktywnie biologicznego selenu znajduje się pod postacią selenoaminokwasów – selenometioniny i selenocysteiny, wbudowane są w strukturę białek. Selenocysteina buduje białka enzymatyczne, tj. peroksydazę glutationową. Zapotrzebowanie na selen

pod wpływem witaminy E zwiększa się, ponieważ utrzymuje go w aktywnej postaci i chroni selenobiałka przed oksydacją (Brzozowski i Bojar 2014).

Kreatyna jest substancją naturalnie występującą w komórkach mięśniowych człowieka. Jest syntetyzowana z aminokwasów: glicyny, argininy i metioniny w trzustce, wątrobie oraz nerkach, jak również w niewielkich ilościach w mózgu i jądrach. Zawartość związku w organizmie wynosi 120-140 gramów, aż 95-98% kreatyny zlokalizowanej jest w komórkach mięśniowych w dwóch formach: wolna kreatyna stanowi 30-40% oraz fosforan kreatyny 60-75%. Po związaniu kreatyny z resztą kwasu fosforowego przyjmuje ona postać fosforanu i jest źródłem energii. Energia ta może zostać zużytkowana jako substrat energetyczny dla mózgu, w mięśniach występuje 3-4 razy więcej fosforanu kreatyny niż adenozynotrójfosforanu. Główną funkcją jest dostarczenie energii do odbudowy zużytych cząsteczek ATP będących pierwszorzędym źródłem energii w czasie skurczu mięśni. Kreatyna jest związkiem występującym w codziennej diecie, źródłem jest czerwone mięso, śledzie, tuńczyk, wieprzowina, mleko. W literaturze zaznacza się antyoksydacyjne właściwości kreatyny, przykładowo na komórki mózgowe. Suplementacja kreatyną korzystnie wpłynęła na całkowity potencjał oksydacyjny osób mających przewlekłe choroby nerek (Szewczyk i Poniewierka 2015).

L-karnityna jest substancją wytwarzaną w organizmie i tylko częściowo dostarczać należy ją z dietą. Syntetyzowana jest w wątrobie, nerkach i mózgu. L-karnityna transportuje kwasy tłuszczowe o długich łańcuchach do organelli jakimi są mitochondria. Kwasy tłuszczowe ulegają przemianom, w wyniku których wytwarzana jest energia niezbędna do prawidłowego funkcjonowania komórek. Pełni ona w tym procesie rolę transportera hydrofobowych kwasów tłuszczowych przez nieprzepuszczalną dla takich związków błonę mitochondrialną. L-karnitynie przypisuje się udział w drugiej linii obrony antyoksydacyjnej – przerywanie kaskadowych reakcji wolnorodnikowych i destrukcyjnych reakcji utleniania. Zmniejsza liczbę uszkodzeń powstałych w wyniku utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, wchodzi w skład fosfolipidów błonowych, jest bardzo ważnym elementem stabilizacji błon komórkowych. Jej antyoksydacyjne działanie potwierdza zdolność do obniżania akumulacji lipofuscyny, związek ten jest markerem procesu peroksydacji lipidów w komórkach organizmu. Mechanizm jej działania wskazuje, iż może ochraniać błony erytrocytów, jak również naczynia krwionośne i dzięki temu zapobiega tworzeniu w nich zmian miażdżycowych (Słowińska-Lisowska i in. 2011).

3. Przegląd literatury

W celu określenia wartości produktów spożywczych utworzono wiele metod mierzących potencjał antyoksydacyjny. Test ORAC pozwala na oznaczenie aktywności przeciwutleniającej produktów pochodzenia roślinnego oraz zwierzęcego, jak również żywności nieprzetworzonej, niskoprzetworzonej, wysokoprzetworzonej i suplementów diety. Uzyskany wynik należy odnieść do wzorca, którym jest troloks - pochodna α - tokoferolu, która jest dobrze rozpuszczalna w wodzie. Reasumując, 1 ORAC to 1 mikromol troloksu, wartości ORAC odnoszą się do 100 gram produktu stałego lub 1dm³ roztworu. Tworzy się również odrębne wartości ORAC dla przeciwutleniaczyo charakterze hydrofilnym H-ORAC oraz lipofilnym L-ORAC lub podaje się zsumowane wartości ORAC (Olędzki 2013).

3.1 Charakterystyka wybranych produktów spożywczych będących źródłem przeciwutleniaczy

Owoce stanowią bogate źródło substancji antyoksydacyjnych, w szczególności polifenoli. Różne gatunki oraz odmiany charakteryzują się innym składem, zarówno jakościowym, jak i ilościowym polifenoli. Zawartość oraz aktywność przeciwutleniająca jest zależna od stopnia dojrzałości owoców oraz warunków w jakich były przechowywane po zbiorach. Owoce borówki czarnej oraz aronii cechują się wysoką aktywnością przeciwutleniającą oraz dużą koncentracją związków polifenolowych, w tym również antocyjanów. Wiśnie, owoce dzikiej róży, jabłka, jeżyny oraz truskawki mają dużą zawartość monomerów oraz oligomerów flawonolowych (Gheribi 2011).

Owoce aronii to bogate źródło antocyjanów, głównie cyjanido-3-galaktozydu, stanowi on 57% wszystkich antocyjanów i cechuje się najwyższą aktywnością przeciwutleniającą wśród wszystkich antocyjanów. Truskawki zawierają pelargonidyno-3-glukozyd, który stanowi 82% antocyjanów, dodatkowo są bogate w kwas elagowy. Żurawina, podobnie jak porzeczka, jest źródłem

kwercetyny, porzeczkę ponadto zawierają delfnidyno-3-rutynozyd. Na szczególne podkreślenie zasługują czerwone winogrona, ponieważ udowodniono w nich występowanie 10 kwasów fenolowych, 16 glukozydów antocyjanowych, 12 związków fenolowych oraz 5 monomerów flawonowych, ponad 6 dimerów i 2 trimery proantocyjanidyn i tanin skondensowanych. Owoce jagodowe mają wysoką zawartość tanin, szczególnie skondensowanych, które uważane są za związki antymutagenne. Liczne badania dowodzą, iż owoce jagodowe i pestkowe cechują się wyższą aktywnością antyoksydacyjną niż owoce cytrusowe. Jagody acai charakteryzują się najwyższym potencjałem przeciwutleniającym wśród wszystkich owoców. Są wyjątkowym źródłem antyoksydantów, ze względu na ich dużą różnorodność oraz zawartość. Zawierają związki fenolowe, tj. antocyjany, bioflawonoidy i fitosterole. Są bardzo bogatym źródłem antocyjanów, w szczególności cyjanidyn, ponieważ zawierają ich więcej niż inne owoce. Jagody acai zawierają o 33 razy więcej antyoksydantów niż czerwone winogrona, potencjał antyoksydacyjny owoców po suszeniu sublimacyjnym sięga 1026 jednostek ORAC (Szajdek i Borowska 2004; Witkowska i Zujko 2009).

Tab. 1 Wartości potencjału antyoksydacyjnego wybranych produktów roślinnych dla 100g świeżej masy produktu wyrażone w jednostkach ORAC (Olędzki 2013).

Rodzaj produktu roślinnego	Wartość ORAC
Suszone śliwki	5770
Borówka czarna	2400
Jarmuż	1770
Truskawki	1540
Szpinak	1260
Brukselka	980
Pomarańcze	750
Papryka czerwona	710
Wiśnie	670

Właściwości przeciwutleniające posiadają też produkty w różnym stopniu przetworzone, siła przeciwutleniająca zależna jest od udziału masy owoców w produkcie spożywczym oraz od procesów, które zostały wykorzystane podczas obróbki (Witkowska i Zujko 2009).

Wina cechują się wybitnie wysoką aktywnością przeciwutleniającą spośród produktów przetworzonych. Związki przeciwutleniające, które obecne są w winie hamują peroksydację lipidów, wstrzymują oksydację frakcji LDL, jak również są inhibitorami enzymów oksydacyjnych. Wysoce dużą aktywność antyoksydacyjną posiadają wina z czerwonych winogron, wina z owoców jagodowych mają istotnie szerszy zakres kumulacji związków fenolowych w porównaniu z winami z czerwonych winogron. Badania dowodzą, iż aktywność przeciwutleniająca wina czerwonego jest 6 razy wyższa niż wina różowego i 17 razy wyższa w porównaniu z winem białym. Dodatkowo wino jest źródłem resweratrolu, który cechuje się wysoką aktywnością antyoksydacyjną. Związek ten produkowany jest przez winorośl w sytuacjach stresowych takich jak infekcje grzybowe, brak wody lub promieniowanie UV. Gromadzony jest przede wszystkim w skórce czerwonych winogron. Resweratrol ma silne działanie przeciwutleniające, ponadto w winie stwierdzono obecność pochodnych tetrahydroksystilbenu, zawierają one 4 grupy hydroksylowe, dzięki czemu mają silniejsze właściwości antyoksydacyjne w porównaniu z resweratrolem, który posiada tylko 3 grupy hydroksylowe (Szajdek i Borowska 2004).

Mniejszą zawartością antyoksydantów charakteryzują się warzywa. Najwyższy potencjał antyoksydacyjny zawierają: jarmuż, czosnek, brukselka, kapusta, buraki, szpinak. Brukselka i jarmuż wykazują największą zdolność wiązania rodników wodorotlenowych, czosnek ma silne właściwości przeciwutleniające dzięki związkom organicznym siarki, takim jak siarczek diallilu, disiarczek diallilu i allicyna. Warzywa są najbogatszym źródłem kwercetyny, kempferolu, jak również innych glikozydów. Cebula czerwona oraz cebula szalotka zawierają duże ilości kwercetyny. Pomidory

i przetwory pomidorowe zawierają likopen. Istnieje związek pomiędzy ilością spożytego likopenu z żywnością a ryzykiem rozwoju chorób serca, ma działanie przeciwnowotworowe (Wawrzyniak i in. 2012).

Nasiona roślin strączkowych również posiadają właściwości antyoksydacyjne, przykładowo: bób, fasola, soja, soczewica i groch. Działanie przeciwutleniające wykazują związki fenolowe glikozydy kwercetyny, izoflawonoidy, katechiny, taniny, kumulują się one głównie w okrywkach nasiennych, dodatkowo nasiona odmian kolorowo kwitnących zawierają więcej związków antyoksydacyjnych. Z pośród wszystkich nasion roślin strączkowych soja ma wyjątkowe właściwości, cechuje się zróżnicowanym składem ilościowym i jakościowym izoflawononów. Fasola kolorowa zawdzięcza swoje cechy przeciwutleniające polifenolom, dominującym jest tanina. Związkiem zawartym w nasionach roślin strączkowych, wykazującym wybitne cechy antyoksydacyjne, jest również fosforan inozytolu, soja cechuje się jego dużą zawartością. Jest przeciwutleniaczem pomocniczym, wspomaga efektywność działania głównych antyoksydantów (Szajdek i Borowska 2004).

Najistotniejszą grupą związków obecnych w surowcach oleistych są tokoferole, występują we wszystkich tłuszczach roślinnych w różnych ilościach. Największe ilości tych związków obecne są w oleju sojowym, kukurydzianym, jak również w oleju z zarodków pszennych. W tłuszczach pochodzenia roślinnego znajdują się m.in. tokotrienole i α -tokoferol, karotenoidy oraz skwalen. Skwalen w największej ilości znajduje się w oliwie z oliwek i oleju z zarodków pszennych. Sezam zawiera sezamol i jego pochodne, olej sezamowy zawiera formę związaną, czyli sezamoliny, dzięki czemu jest odporny na procesy oksydacji. Dodatek oleju sezamowego do innych tłuszczów roślinnych skutkuje zwiększeniem ich trwałości. Polifenole zawarte w nasionach stabilizują oleje (Witkowska i Zujko 2009).

Herbata cechuje się nadzwyczajnymi cechami przeciwutleniającymi. Związki fenolowe stanowią nawet 35% suchej masy liści i to właśnie one są odpowiedzialne za właściwości antyoksydacyjne herbaty. Związki fenolowe zawarte w tym produkcie to: katechiny, tearubiginy i teaflawiny. Największe ilości katechiny zawiera herbata zielona, tearubiginy i teaflawiny powstają podczas fermentacji liści herbacianych i dominują w składzie herbaty czarnej. W porównaniu z herbatą zieloną, czarna posiada mniejszy potencjał antyoksydacyjny. Skład ilościowy i jakościowy jest zmienny i różni się w zależności od gatunku herbaty oraz od metody sporządzania naparu. Wydłużony czas parzenia herbaty do 10 minut zwiększa zawartość polifenoli, a co za tym idzie, potencjał antyoksydacyjny (Szajdek i Borowska 2004).

Obszerna grupa produktów, w której występują antyoksydanty to zioła i przyprawy. Jedne z bardziej istotnych to: rozmaryn, szałwia, tymianek, oregano, kurkuma, imbir, papryka i chili. Przyprawy są bogatym źródłem diterpenów fenolowych, kwasów fenolowych i flawonoidów. Dodatek do przygotowywanych potraw zapobiega w pewnym stopniu tworzeniu produktów oksydacji (Szajdek i Borowska 2004).

4. Podsumowanie i wnioski

Ważną rolę w ochronie organizmu przed negatywnymi skutkami oddziaływania wolnych rodników odgrywają przeciwutleniacze. Produkty spożywcze stanowią bogate źródło wielu przeciwutleniaczy, między innymi związków fenolowych, witamin A, C i E oraz karotenoidów. Obecność w codziennej diecie antyoksydantów, a głównie zachowanie odpowiedniego ich spożycia jest bardzo ważnym elementem w profilaktyce powstawania wielu chorób. Pozwalają zmniejszyć ryzyko choroby wieńcowej, udaru mózgu, chorób naczyń obwodowych. Chronią przed czynnikami powodującymi raka. Podnoszą ogólną odporność organizmu na zakażenia i infekcje. Łagodzą przebieg wielu chorób.

5. Literatura

Brzozowski I, Bojar I (2014) Stężenie pierwiastków (cynku, miedzi i selenu) biorących udział w reakcjach stresu oksydacyjnego u pacjentek ciężą powikłaną cukrzycą typu I. EJMT 4(5): 55-66.

- Dudkowska M, Kucharewicz K (2014) Związki pochodzenia naturalnego modulujące starzenie i śmierć komórek. *Postępy Biochemii* 60(20): 207-220.
- Gheribi E (2011) Związki polifenolowe w owocach i warzywach. *Medycyna Rodzinna* 4: 91-95.
- Guz J, Dziaman T, Szpila A (2007) Czy witaminy antyoksydacyjne mają wpływ na proces karcynogenezy? *Postępy Hig Med Dosw* 61: 185-198.
- Krasnowska G, Sikora T (2011) Suplementy diety a bezpieczeństwo konsumenta. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 4(77): 5-23.
- Majewska M, Czeczot H (2009) Flawonoidy w profilaktyce i terapii. *Farm Pol* 65(5): 369-377.
- Miktus M (2006) Rola koenzymu Q10 we współczesnej medycynie. *Nutrition & Health* 9(5): 1-12.
- Olędzki R (2013) Znakowanie żywności pod względem wartości antyoksydacyjnej. *Nauki Inżynierskie i Technologiczne* 3(10): 80-91.
- Urbański K, Nowak M, Guzik T (2013) Wpływ stresu oksydacyjnego na funkcjonowanie naczyń krwionośnych. *Postępy Biochemii* 59(4): 424-431.
- Skólmowska M, Kmiec M (2011) Enzymosomy antyoksydacyjne – właściwości i zastosowanie. *Postępy Hig Med Dosw* 65: 640-644.
- Słowińska-Lisowska M, Zembroń-Łacny A, Kopeć W (2011) Karnozyna i jej wpływ na możliwości wysiłkowe człowieka. *Medycyna Sportowa* 2(4): 133-139.
- Sroka Z, Gamian A, Cisowski W (2005) Niskocząsteczkowe związki przeciwutleniające pochodzenia naturalnego. *Postępy Hig Med Dosw* 58: 34-41.
- Szajdek A, Borowska J (2004) Właściwości przeciwutleniające żywności pochodzenia roślinnego. *Żywność Nauka Technologia Jakość* 41(4): 5-28.
- Szewczyk P, Poniewierka E (2015) Kreatyna – zastosowanie w sporcie i medycynie. *Piel Zdr Publ* 5(4): 409-416.
- Szymańska-Pasternak J, Janicka A, Bober J (2011) Witamina C jako oręż w walce z rakiem. *Via Medica* 7(1): 9-23.
- Wawrzyniak A, Krotki M, Stoparczyk B (2012) Właściwości antyoksydacyjne owoców i warzyw. *Medycyna Rodzinna* 1: 19-23.
- Wdowiak A, Wdowiak A (2013) Rola dysmutazy nadtlenkowej i wolnych rodników w zaburzeniach męskiej płodności. *EJMT* 1(1): 53-59.
- Wielkoszyński T, Zawadzki M, Lebek-Ordon A. i in. (2007) Enzymatyczne układy antyoksydacyjne – właściwości, występowanie i rola biologiczna. *Diagn Lab* 43: 283-294.
- Witkowska A, Zujko M (2009) Aktywność antyoksydacyjna owoców leśnych. *Bromat Chem Toksykol* 52(3): 900-903.
- Zabłocka A, Janusz M (2008) Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Postępy Hig Med Dosw* 62: 118-124.

17. Udział chemokin i ich receptorów w etiopatogenezie łuszczycy

The role of chemokines and their receptors in the etiopathogenesis of psoriasis

Karolina Strzelec⁽¹⁾, Joanna Miśkiewicz⁽¹⁾, Agata Krawczyk⁽²⁾, Magdalena Kimsa-Dudek⁽²⁾, Barbara Strzałka-Mrozik⁽¹⁾

⁽¹⁾ Zakład Biologii Molekularnej Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾ Zakład Nutrigenomiki i Bromatologii Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Barbara Strzałka-Mrozik

Karolina Strzelec: karolina.strzelec@med.sum.edu.pl

Słowa kluczowe: dysfunkcje dermatologiczne, blaszka łuszczykowa, cytokiny chemotaktyczne, cytokiny prozapalne, limfocyty Th17

Streszczenie

Łuszczyca stanowi przewlekłą, proliferacyjną jednostkę chorobową komórek naskórka, z charakterystyczną zmianą kliniczną określaną mianem blaszki łuszczykowej. Etiopatogeneza choroby jest nadal nieokreślona. Szczególną rolę w rozwoju choroby przypisuje się mediacji układu odpornościowego. Spośród szerokiej gamy czynników immunologicznych istotną funkcję odgrywają chemokiny, będące cytokinami chemotaktycznymi. Są to niskocząsteczkowe białka, dzięki którym komórki odpornościowe uzyskują informację o toczących się w obrębie ustroju reakcjach zapalnych, jednocześnie umożliwiając aktywację odpowiedzi typu komórkowego. Wymieniona komunikacja pomiędzy poszczególnymi komponentami byłaby niemożliwa, gdyby nie ich interakcje wraz ze swoistymi receptorami. Szczególnie ważną chemokiną, odgrywającą rolę w patogenezie łuszczycy jest CCL20. Funkcję jej receptora odgrywa CCR6, o czym świadczy wykorzystanie CCL20, jako miejsca docelowego działania terapeutycznego leków. Układ CCL20/CCR6 wiąże się ponadto, z aktywacją komórek Th17, także odznaczających się aktywnością prozapalną.

1. Łuszczyca

Łuszczyca (*psoriasis*) to przewlekła choroba układowa, której siłą napędową jest rozwój procesu zapalnego. Istotną rolę w jej rozwoju odgrywa również mediacja układu odpornościowego, dlatego też zaliczana jest do grupy chorób autoimmunologicznych. Charakterystyczną cechą kliniczną w przebiegu łuszczycy są zmiany skórne oraz w przypadku łuszczykowego zapalenia stawów (ŁZS)- zajęcie stawów (Nestle i in. 2009; Christensen i in. 2006).

Typowa zmiana skórna występuje w postaci lekko wzniesionej, odgraniczonej od zdrowej powierzchni skóry, rumieniowatej lub owalnej srebrzystej łuski określanej mianem blaszki łuszczykowej. Proces chorobowy rozwija się na skutek nadmiernego namnażania się komórek naskórka, czyli keratynocytów. W wyniku przyspieszonego dojrzewania komórek, połączonego z ich utrudnionym rogowaceniem, dochodzi do wzrostu grubości keratynocytów w obrębie zmiany określanej mianem akantozy. Ponadto, na wygląd całej patologii ma wpływ toczące się w obrębie skóry właściwej zapalenie, w którym głównie uczestniczą: komórki dendrytyczne, makrofagi i limfocyty T. Ostatecznie dochodzi do rozwoju cienko-, jak i gruboblaszkowych zmian klinicznych tak zwanych sopli naskórkowych. Bardzo często zanika również warstwa ziarnista naskórka. Nagromadzenie się neutrofilii i limfocytów stwarza możliwość rozwoju struktur o nazwie „mikroropnie Munro”. Kolor zmiany uzależniony jest od liczebności naczyń krętych, przy towarzyszącym jednocześnie nasileniu procesu angiogenezy. Lokalizacja zmian chorobowych jest różna: od owłosionej skóry głowy po łokcie oraz kolana (Nestle i in. 2009; Christensen i in. 2006; Reich 2012; Wolska i Langer 2006; Kolanko 2017).

Szacuje się, że zachorowalność na łuszczycę dotyczy około 2-3% populacji na świecie, bez grupy uprzywilejowanej wiekowo w kierunku rozwoju choroby. Ponadto, stanowi ona jedną z najczęstszych dysfunkcji dermatologicznych na świecie. Dodatkowo, na podstawie wyników badań epidemiologicznych wyciągnięto wnioski, że zachorowalność na łuszczycę koreluje z zapadalnością na inne przewlekłe jednostki chorobowe, takie jak: reumatoidalne zapalenie stawów (*rheumatoid arthritis*, RZS) oraz nieswoiste zapalenia jelit (*inflammatory bowel disease*, IBD) w skład których wchodzi między innymi: wrzodziejące zapalenie jelita grubego oraz choroba Leśniowskiego-Crohna. Do schorzeń towarzyszących łuszczycy zalicza się: otyłość, cukrzycę, zespół metaboliczny, a także zaburzenia krążenia obwodowego. Z uwagi na fakt, negatywnego wpływu łuszczycy na zdrowie psychiczne, często również dochodzi do rozwoju depresji i stanów lękowych (Reich 2012; Lebowohl 2003; Neimann 2006; Spah 2008; Neneman i Adamski 2009).

2. Etiopatogeneza łuszczycy

Etiopatogeneza łuszczycy nie jest ściśle określona. Jednak, kluczową rolę w rozwoju choroby odgrywają trzy grupy bodźców: czynniki genetyczne, immunologiczne oraz środowiskowe.

Dużą grupą, odgrywającą ważne znaczenie w etiopatogenezie choroby stanowią uwarunkowania genetyczne. W przypadku łuszczycy obserwuje się rodzinną skłonność, zwłaszcza wśród pokrewieństwa rzędu pierwszego i drugiego stopnia wraz z wielogenowym typem dziedziczenia. Ponadto, istotną rolę przypisuje się genom kodującym antygeny zgodności tkankowej (*human body antigen*, HLA) a dokładniej HLA-Cw6, warunkując tym samym wystąpienie łuszczycy typu I (w łuszczycy typu II nie obserwuje się związku z HLA-Cw6). Za kluczową grupę genów warunkujących podatność w kierunku rozwoju łuszczycy uważa się – geny PSORS numerowane kolejno od PSORS1 do PSORS9 (Neneman i Adamski 2009; Wolska i Langer 2006; Kolanko 2017).

Uwarunkowania środowiskowe związane są zarówno z endogennym, jak i egzogennym podłożem choroby. Wśród ogniw o podłożu zewnątrzpochodnym wymienia się fizyczne urazy mechaniczne: m.in. akupunkturę, zabiegi chirurgiczne a także promieniowanie UV lub RTG. W grupie wewnątrzpochodnych czynników środowiskowych wyróżnia się wpływ: diety, alkoholu, dymu papierosowego, stresów psychicznych, leków, infekcji wirusowych, zakażeń bakteryjnych oraz grzybiczych (Neneman i Adamski 2009; Langley i in. 2005; Wolska i Langer 2006).

Szczególnie liczną oraz ważną grupę w etiopatogenezie łuszczycy odgrywają komponenty układu odpornościowego takie jak: zwiększona liczebność populacji komórek immunologicznych, występowanie autoreaktywnych limfocytów T, udział cytokin prozapalnych ze szczególnym uwzględnieniem roli czynnika martwicy nowotworu- α (*tumor necrosis factor- α* , TNF- α). Bardzo często mediacji immunologicznej przypisuje się kluczową rolę w patogenezie choroby, stawiając wybrane czynniki przed pozostałymi grupami (Neneman i Adamski 2009; Wolska i Langer 2006; Victor i in. 2003; Markham i Lamb 2000).

Do kluczowych komórek układu odpornościowego zaangażowanych w rozwój łuszczycy należą limfocyty T. W wyniku reakcji ze swoistymi antygenami dochodzi do wzrostu ich aktywności. Ponadto, to właśnie one a dokładniej reaktywna populacja komórek o fenotypie Th17 jest odpowiedzialna za przewlekły charakter tego schorzenia. Rolę potencjalnych antygenów mogą pełnić: keratyna, białka szoku cieplnego (*heat shock proteins*, HSP) lub przeciwbakteryjny peptyd LL37. Najistotniejszą rolę przypisuje się antygenowi melanocytarnemu ADAMTSL5, odpowiedzialnemu za inicjację procesów autoimmunologicznych, w wyniku których powstają autoreaktywne, klonalne limfocyty T (Kolanko 2017; Heidenreich i in. 2009; Croates i in. 2016; Lowes i in. 2007).

Czynnik martwicy nowotworu TNF- α stanowi cytokinę prozapalną. Jej głównym źródłem są makrofagi, monocyty, keratynocyty, czy też komórki Langerhansa (dendrytyczne). Wśród jej głównych zadań w etiopatogenezie łuszczycy wyróżnia się: udział w rozwoju wczesnych zmian klinicznych, pobudzenie aktywności limfocytów Th1 a także wpływ na namnażanie i działanie limfocytów B, komórek NK (*natural killer*) w obrębie blaszek łuszczycowych. Dodatkowo, TNF- α stymuluje uwalnianie innych cytokin między innymi: interferonu γ (IFN- γ), interferonu β (IFN- β), czynnika aktywującego płytki (*platelet-activating factor*, PAF) oraz interleukiny: IL-1, IL-6. Wykazano istotną korelację pomiędzy aktywnością czynnika martwicy nowotworu- α

a równoczesnym rozwojem łuszczycy. Stanowi on także docelowy punkt działania wielu terapii biologicznych (Neneman i Adamski 2009; Wolska i Langer 2006; Victor i in. 2003; Markham i Lamb 2000; Kolanko 2017).

Dodatkowo, spośród grupy innych cytokin prozapalnych zaangażowanych w przebieg choroby wymienia się: IL-1, IL-6, IL-8, IL-23, IL-12 a także niezwykle ważną grupę określaną mianem chemokin (Neneman i Adamski 2009).

3. Chemokiny

Chemokiny należą do rodziny cytokin z grupy chemotaktycznych, które pełnią szereg funkcji zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych. Są to białka o niskocząsteczkowej masie wydzielane przez leukocyty oraz komórki tkanek. Dodatkowo, ich synteza połączona wraz z jednoczesną sekrecją może odbywać się w sposób ciągły lub w wyniku indukcji przez odpowiednie bodźce (Waśniowska 2004; Henc i Bryl 2013). Do podstawowych funkcji danych cytokin chemotaktycznych należy selekcja limfocytów, celem prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego w walce z antygenami chorobotwórczymi. To dzięki nim, możliwa jest mobilizacja leukocytów oraz kontrola ich przemieszczania się między krwią a tkankami. Do innych, równie ważnych zadań chemokin, zalicza się ich udział w formowaniu się nowych naczyń krwionośnych, w gojeniu ran oraz w procesach embriogenezy w okresie rozwoju zarodkowego, jak i organogenezy a także regulacja procesu apoptozy. Chemokiny zaangażowane są również w wiele procesów patologicznych. Biorą udział w rozwoju chorób autoimmunologicznych, alergii, czy też chorób zapalnych oraz nowotworowych (Waśniowska 2004; Henc i Bryl 2013).

Udział chemokin w procesach regulujących stan równowagi wewnętrznej ustroju, czyli homeostazie, powoduje, że są one produkowane w sposób konstytutywny. Wybrane cytokiny m.in. zapalne zaangażowane w rozwój niepożądanych działań są uwalniane dopiero po zakażeniu lub jako wypadkowa reakcji zachodzących w trakcie zapalenia (Waśniowska 2004; Henc i Bryl 2013).

Pod względem budowy chemicznej chemokiny są peptydami, które składają się z 66-111 aminokwasów w cząsteczce. W ich budowie wyróżnia się wysoce konserwatywną strukturę trzeciorzędową, której stabilizacja odbywa się przy pomocy wiązań disiarczkowych pomiędzy cysteinami (Cys), występującymi odpowiednio: pomiędzy 1 a 3 (Cys1-Cys3) lub 2 a 4 (Cys2-Cys4). Ich systematyzacja odbywa się poprzez różnice występujące w strukturze molekuła a nie pełnionych przez nie funkcji. Według obowiązującej nomenklatury należy dodawać do podstawy grupy oznaczenie „L” (ligand) oraz numer. Dzięki tak przyjętym zasadom, możliwe jest zachowanie porządku w systematyce rodziny chemokin (Waśniowska 2004).

Wyróżniono cztery grupy chemokin. Kryterium podziału stanowi liczba oraz umiejscowienie aminokwasów endogennych - cystein przy N-końcu łańcucha polipeptydowego (koniec aminowy łańcucha polipeptydowego). W skład pierwszej grupy wchodzi cytokiny chemotaktyczne, w strukturze których wyróżnia się dwie pierwsze cysteiny zlokalizowane tuż obok siebie. Ich oznaczenie to CC. W kolejnym kręgu zlokalizowane są chemokiny CXC, w budowie których obecny jest jeden aminokwas pomiędzy dwoma cysteinami. Natomiast trzecią grupę tworzą cząsteczki CX3C-cysteiny oddzielone trzema aminokwasami. Czwartą a zarazem ostatnią grupę tworzą chemokiny określane, jako C składające się z dwóch cytokin Cys1 oraz Cys 4 względem wyżej wymienionych grup (Waśniowska 2004; Radzik i in. 2015; Mabuchi i in. 2012).

Ponadto, w grupach CC oraz CXC wyróżnia się charakterystyczne motywy umożliwiające prawidłowe ich funkcjonowanie. W grupie CXC sekwencja aminokwasów: kwas glutaminowy-leucyna-arginina (Glu-Leu-Arg) usytuowana przed pierwszą cysteiną w części N-końcowej łańcucha polipeptydowego tworzy strukturę określoną, jako ELR. Dzięki jej obecności, możliwe jest pobudzenie granulocytów obojętnochłonnych oraz ingerencja w proces angiogenezy, jednak, dopiero po połączeniu się z receptorem CXCR2. Dodatkowo, funkcjonuje również podgrupa nie-ELR CXC. Spośród chemokin do niej należących, tylko CXCL12 posiada wyżej wymienione właściwości na skutek swoistej reakcji z receptorem CXCR4. Grupa CC dzieli się na dwie podgrupy: MIPs (*macrophages inflammatory protein*-białko zapalne makrofagów) oraz MCPs (*monocyte chemotactic protein*-białkowy chemotraktant monocytów). Żadna z podgrup nie wykazuje możliwości współpracy z neutrofilami (Waśniowska 2004; Radzik i in. 2015).

Dzięki obecności chemokin w organizmie możliwy jest przebieg wielu istotnych procesów. Jednak, wcześniej musi nastąpić interakcja danej cząsteczki chemotaktycznej ze swoim receptorem. Wynikiem takiej reakcji jest włączenie odpowiedzi typu komórkowego. Obowiązująca terminologia powstaje adekwatnie do nazewnictwa ligandów. Do motywu grupy oraz jej numeru dołącza się jedynie literę „R” oznaczającą receptor. Wyjątek stanowi grupa C, którą wyznacza następujący wzór: CXCR1 (Henc i Bryl 2013; Waśniowska 2004).

Receptory cytokin chemotaktycznych należą do grupy receptorów sprzężonych z białkiem G (*G protein coupled receptors*, GPCRs) klasy A (*rhodopsin like*). Ich elementem strukturalnym jest siedmiohelikalny przezłonowy element związany z białkiem G. W wyniku interakcji ze swoim ligandem, dochodzi do uaktywnienia się białka G. W ten sposób rozpoczyna się kaskada reakcji prowadząca kolejno do: aktywacji fosfolipazy C, enzymatyczny proces, którego produktami są fosfatydyloinozytol (IP3) oraz diacyloglicerol (DAG) z substratu będącego dwufosforanem fosfatydyloinozytolu (PIP2). Pod wpływem IP3 następuje uwolnienie wapnia (Ca^{2+}) z siateczki śródplazmatycznej, aż w końcu następuje jego napływ z środowiska zewnętrznego komórki, skutkując wzrostem stężenia Ca^{2+} we wnętrzu jednej ze składowych ustroju. Dzięki temu, możliwe jest prawidłowe funkcjonowanie elementów kurczliwych cytoszkieletu komórkowego, czy też pobudzenie sprawności integryn, będących cząsteczkami adhezyjnymi. DAG wpływa na procesy degranulacji lizosomów oraz metabolizm kwasu arachidonowego (Waśniowska 2004; Radzik i in. 2015; Henc i Bryl 2013).

Receptory mogą być stale zlokalizowane na powierzchni komórek lub ulegać ekspresji dopiero po jej aktywacji. Dodatkowo, w ustroju niektóre receptory znajdują się na ściśle określonych komórkach. W wyniku czego możliwa jest ciągła regulacja odpowiedzi komórkowej, zapewniając w ten sposób homeostazę organizmu. Przykładowo granulocyty obojętnochłonne charakteryzują się obecnością na swojej powierzchni receptorów CXCR1 oraz CXCR2. Monocyty oraz granulocyty kwaso-, zasadochłonne wykazują ekspresję zarówno dla swoich, jak i wspólnych (np. CCR1) dla powyższych trzech populacji komórek receptorów. W przypadku limfocytów T możliwe jest zlokalizowanie na ich powierzchni grup CXCR lub CCR, w zależności od kontaktu z antygenem. Natomiast, limfocyty B charakteryzują się obecnością cząsteczki CXCR5. Komórki dendrytyczne w fazie rozwoju przejawiają na swojej powierzchni ekspresję receptorów dla swoich cząsteczek prozapalnych takich jak: CCR1, CCR2, czy CXCR1. W pełni ukształtowane komórki charakteryzują się obecnością odbiorników cytokin konstytutywnych: CCR7 oraz CXCR4 (Waśniowska 2004; Radzik i in. 2015; Henc i Bryl 2013).

Istotną kwestią jest możliwość połączenia się swojego receptora tylko i wyłącznie z jedną, konkretną chemokiną. Ligand może wiązać się z kilkoma cząsteczkami receptorowymi, które mogą rozpoznawać większą ich liczbę pod warunkiem, że odznaczają się przynależnością do jednej grupy (Henc i Bryl 2013).

Aktywność transkrypcyjna cząsteczek cytokin chemotaktycznych oraz ich receptorów podlega regulacji za pomocą różnorodnych czynników takich jak: stany hipoksji, wirusy, składniki produktów metabolizmu bakteryjnego a także cząsteczki adhezyjne czy, stres. Cytokiny o charakterze prozapalnym: IL-1 lub TNF- α wykazują wpływ na przebieg odpowiedzi wrodzonej-CXCL8. Natomiast, interferony, glikokortykosteroidy lub czynniki przeciwzapalne-IL-10 mogą wykazywać ujemny wpływ na procesy sekrecji cząsteczek chemotaktycznych. Glikozaminoglikany w wyniku reakcji z chemokinami uczestniczą w rozwoju lokalnego gradientu, przyciągającego leukocyty powodując ich unieruchomienie. Istnieją również cząsteczki określane mianem „cichych receptorów”. W wyniku integracji antygeny Duffy (*Duffy antigen receptor for chemokines*), białka D6 lub CCX-CR z proteinami spokrewnionymi z GPCR (receptory sprzężone z białkiem G, *G-protein coupled receptor*). Ich mechanizm działania opiera się na inhibicji przewodnictwa sygnału i zmianach stężenia jonów wapnia inaktywując chemokiny, w sposób nie zaburzający homeostazy ustroju (Henc i Bryl 2013).

4. Kompleks chemokina CCL20-receptor chemokinowy CCR6

W przebiegu łuszczycy najbardziej charakterystyczną chemokiną, uczestniczącą w etiopatogenezie choroby jest cząsteczka CCL27, której swoim receptorem jest CCR10

zlokalizowany na powierzchni większości limfocytów T. Głównym zadaniem danych komórek w trakcie rozwoju choroby jest aktywny udział w ewolucji procesu zapalnego, w wyniku czego dochodzi do T-komórkowego zapalenia skóry z jednoczesnym zaburzeniem czynności keratynocytów (Henc i Bryl 2013; Singh i in. 2008).

Równie istotną cytokiną chemotaktyczną odznaczającą się istotnym wpływem na procesy patologiczne w przebiegu łuszczycy jest konstytutywna cząstka CCL20. W piśmiennictwie uwzględniającym dawną nomenklaturę określana jest również mianem LARC, MIP-3a, Scya-20, ST38, Ck-beta-4, czy też exodus1. O udziale w etiopatogenezie opisywanej jednostki chorobowej świadczy m.in. uznanie jej za jeden z możliwych celów leczniczych. Receptorem dla powyższego chemoatraktantu jest CCR6 (Henc i Bryl 2013; Waśniowska 2004).

W przypadku osoby zdrowej nie stwierdza się wysokiej aktywności transkrypcyjnej chemokiny CCL20. Jednak w przypadku pacjentów zmagających się z łuszczycą, w ich naskórku dochodzi do wzrostu jej stężenia, co następuje pod wpływem innych komponentów prozapalnych np. TNF- α , IL-1. Wyniki badań sugerują, że wysoka selektywność elementów reakcji ligand-receptor może utrudniać rekrutację komórek ze skóry właściwej do toczącego się w obrębie naskórka zapalenia (Henc i Bryl 2013).

Receptor CCR6 u człowieka kodowany jest przez gen zlokalizowany na chromosomie 6. Jego ekspresję wykazują limfocyty B, komórki dendrytyczne (Langerhansa), czy też komórki T, istotne zwłaszcza w rozwoju łuszczycy Th17. Pod wpływem wzrostu stężenia cząsteczki CCL20 dochodzi do chemotaksji wyżej wymienionych elementów komórkowych. Dodatkowo, niezwykle ważną charakterystyczną cechą cząsteczki CCL20 jest jej stała ekspresja w komórkach nabłonkowych spłotu naczyńiówkowego u człowieka oraz myszy. Według najnowszych wyników badań duży nacisk kładzie się na potencjalny wpływ kompleksu CCL20-CCR6 w przebiegu chorób zapalnych, takich jak łuszczycy lub reumatoidalne zapalenie stawów, na wędrówkę komórek Th17 do ognisk zapalnych. Dlatego też, sugeruje się przedostawanie się powyższych komórek do miejsca zapalenia w obrębie układu CCL20-CCR6 i pełnionej przez receptor CCR6 czynności kontroli immunologicznej. Zatem, CCL20 i CCR6 uczestniczą w tych zaburzeniach poprzez ponowne ukierunkowanie komórek Th17 do tkanek docelowych (Henc i Bryl 2013; Radzik i in. 2015; Singh i in. 2008; Mabuchi 2012).

Ponadto, kluczową cechą limfocytów Th17 jest synteza głównie IL-17, ale również innych cząsteczek o charakterze cytokin takich jak: IL-21 oraz IL-23, warunkująca jednocześnie ich prawidłowe funkcjonowanie i udział w rozwoju zmian autoimmunologicznych obserwowanych m.in. w łuszczycy (Radzik i in. 2015; Mabuchi 2012).

Zapalenie wywołane przez IL-17 charakteryzuje się naciekaniem neutrofilów. Dodatkowo, komórki T CCR6 w skórze wytwarzają CXCL8 a granulocyty obojętnochłonne wytwarzające CCL20, wykazują następczą ekspresję CCR6. Wykazano również, że IL-17 występuje, jako silny induktor CCL20. Zatem, CCL20 i CCR6 przyczyniają się do dodatniej pętli sprzężenia zwrotnego obejmującej komórki T, komórki dendrytyczne, neutrofile i komórki nabłonkowe wzmacniając tym samym odpowiedź zapalną Th17 (Singh i in. 2008).

Wyniki badań przedstawione przez Singh'a i współpracowników potwierdzają, że stała ekspresja receptora CCR6 odgrywa ważną rolę we wzroście i różnicowaniu się komórek o fenotypie Th17. Dlatego przypuszcza się, że blokada CCR6 mogłaby przynieść ogromne korzyści w leczeniu uszkodzonych tkanek przez limfocyty T odznaczające się produkcją IL-17 (Singh i in. 2008).

5. Podsumowanie

Łuszczycy to jednostka chorobowa, charakteryzująca się niezwykle złożoną etiopatogenezą. Kluczową rolę w jej rozwoju odgrywają czynniki immunologiczne, których ważną komponentą są cytokiny chemotaktyczne. Szereg badań nad chemokinami oraz ich receptorami potwierdza ich istotny udział w rozwoju procesów prozapalnych, czy też autoimmunizacyjnych, z którymi wiąże się przebieg wyżej wymienionej dysfunkcji dermatologicznej. Przykładowo, ekspresja konstytutywnej chemokiny CCL20 wraz z jej swoistym receptorem CCR6 w naskórku pacjentów z łuszczycą indukuje kaskadę reakcji, odpowiedzialnych za rozwój i utrzymanie choroby. Zatem, wspólna sieć

powiązań stwarza nowe możliwości terapeutyczne, których celem jest zablokowanie receptorów chemokinowych lub modyfikowanie ich czynności.

6. Literatura

- Christensen TE, Callis KP, Papenfuss J et al. (2006) Observations of psoriasis in the absence of therapeutic intervention identifies two unappreciated morphologic variants, thin-plaque and thick-plaque psoriasis, and their associated phenotypes. *Journal of Investigative Dermatology* 126: 2397-2403.
- Croates LC, FitzGerald O, Helliwell PS et al. (2016) Psoriasis, psoriatic arthritis, and rheumatoid arthritis: Is all inflammation the same? *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2 (16): 30064-30066.
- Heidenreich R, Röcken M, Ghoreschi K (2009) Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. *International Journal of Experimental Pathology* 90: 232-248.
- Henc I, Bryl E (2013) Chemokiny jako ważne mediatory stanu zapalnego. *Forum Medycyny Rodzinnej* 7 (5): 251-262.
- Kolanko M (2017) Etiopatogeneza łuszczycy. *Aesthetica* 20:44-47.
- Langley RGB, Krueger GG, Griffiths CEM (2005) Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. *Annals of the Rheumatic Diseases* 64: 18-23.
- Lebwohl M (2003) Psoriasis. *Lancet* 361: 1197-1204.
- Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG (2007) Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 445: 866-873.
- Mabuchi T, Chang TW, Quinter S et al. (2012) Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis. *Journal of Dermatological Science* 65: 4-11.
- Markham A, Lamb HM (2000) Infliximab. A review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs* 59: 1341-1351.
- Neimann AL, Shin DB, Wang X et al. (2006) Prevalence of cardiovascular risk factor in patients with psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 55: 829-835.
- Neneman A, Adamski Z (2009) Aspekty kliniczne i epidemiologiczne zaburzeń ogólnoustrojowych u chorych na łuszczycę. *Forum Medycyny Rodzinnej* 3 (6): 447-453.
- Nestle FO, Kaplan DH, Barker J (2009) Łuszczyca. *Dermatologia po dyplomie* 0 (1): 18-30.
- Radzik TŁ, Głabiński A, Żylińska L (2015) Receptory chemokin z motywem CC w układzie nerwowym. *Postępy biochemii* 61 (4): 436-443.
- Reich K (2012) Łuszczyca jako układowa choroba zapalna: implikacje dla postępowania. *Dermatologia po dyplomie* 3 (4): 4-15.
- Singh SP, Zhang HH, Foley JF et al. (2008) Human T Cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *The Journal of Immunology* 180: 214-221.
- Spah F (2008) Inflammation in atherosclerosis and psoriasis: common pathogenic mechanisms and the potential for an integrated treatment approach. *British Journal of Dermatology* 159 (2): 10-17.
- Victor FC, Gottlieb AB, Menter A (2003) Changing paradigms in dermatology: tumor necrosis factor alpha (tnf- α) blockade in psoriasis and psoriatic arthritis. *Clinics in Dermatology* 21: 292-297.
- Waśniowska K (2004) Chemokiny-perspektywy zastosowania związków blokujących ich działanie w terapii. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (online)* 58: 37-46.
- Wolska H, Langner A (2006) Łuszczyca. Wydawnictwo: Czelej Lublin.

18. Rola interleukiny 17 (IL-17) w przebiegu wybranych spondyloartropatii zapalnych

The role of interleukin 17 (IL-17) in the course of selected inflammatory spondyloarthritis

Karolina Strzelec⁽¹⁾, Joanna Miśkiewicz⁽¹⁾, Agata Krawczyk⁽²⁾, Dominika Wcisło-Dziadecka⁽³⁾, Barbara Strzałka-Mrozik⁽¹⁾

⁽¹⁾ Zakład Biologii Molekularnej Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾ Zakład Nutrigenomiki i Bromatologii Katedry Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽³⁾ Zakład Kosmetologii, Katedra Kosmetologii, Wydział Nauk farmaceutycznych
Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Barbara Strzałka-Mrozik

Karolina Strzelec: karolina.strzelec@med.sum.edu.pl

Słowa kluczowe: łuszczycowe zapalenie stawów, nieswoiste choroby zapalne jelit, cytokiny prozapalne, sekukinumab

Streszczenie

Spondyloartropatie zapalne (SpA) to grupa schorzeń w przebiegu których dochodzi do zapalenia stawów z towarzyszącym zajęciem stawów kręgosłupa. Do SpA zalicza się m.in.: łuszczycowe zapalenie stawów oraz zapalenia stawów w przebiegu nieswoistych chorób zapalnych jelit. W ich przebiegu występuje szereg różnorodnych objawów klinicznych a w etiopatogenezie ważną rolę odgrywają cytokiny z rodziny interleukiny 17 (IL-17), które odpowiadają za indukcję reakcji zapalnych w ustroju. W przypadku ciężkiego rzutu choroby, przy braku skuteczności klasycznych metod terapeutycznych wprowadza się leczenie biologiczne. Przykładem specyficznego leku, skierowanego przeciwko IL-17 jest sekukinumab, będący ludzkim przeciwciałem monoklonalnym. W wyniku jego działania dochodzi do zmniejszenia się liczności aktywnych biologicznie cząsteczek IL-17, co przyczynia się do normalizacji procesu chorobowego. Jednak, przed wcześniejszym podjęciem decyzji o wprowadzeniu do schematu leczenia leku biologicznego należy uwzględnić stan pacjenta, aktywność choroby oraz profil bezpieczeństwa działania danego leku.

1. Spondyloartropatie zapalne

Spondyloartropatie zapalne (*spondyloarthritis*, SpA) stanowią przewlekły stan chorobowy, charakteryzujący się jednoczasowym zapaleniem stawów oraz zajęciem stawów kręgosłupa. Zaliczane są do grupy schorzeń reumatycznych. Spośród szerokiej gamy objawów klinicznych, wyróżnia się manifestację układu mięśniowo-szkieletowego pod postacią zapalenia kręgosłupa i jego okolic, zapalenia stawów obwodowych i przyczepów ścięgniastych, czy też sztywność poranną z towarzyszącym bólem zapalnym pleców. Do objawów pozastawowych, które rozwijają się u 40% chorych zalicza się: stan zapalny w obrębie przedniego odcinka błony naczyniowej oka a także występowanie innych procesów patologicznych takich jak łuszczyca (*psoriasis*), nieswoiste choroby zapalne jelit (*inflammatory bowel disease*, IBD) oraz dysfunkcje układu krążenia (Felis-Giemza 2017; van der Horst-Bruinsma i Nurmohamed 2012).

Do SpA zalicza się między innymi: zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa, łuszczycowe zapalenie stawów, reaktywne zapalenie stawów i zapalenia stawów w przebiegu zapalnych chorób jelit. Dodatkowo, funkcjonuje podział na spondyloartropatie zapalne obwodowe oraz osiowe, gdzie w ich etiopatogenezie szczególną rolę przypisuje się czynnikom genetycznym. Jedną z predyspozycji rozwoju SpA jest obecność konkretnych antygenów zgodności tkankowej HLA (*human leukocyte antigen*). Szacuje się, że HLA-B27 występuje u około 40-90% pacjentów z tym

schorzeniem (Felis-Giemza 2017; van der Horst-Bruinsma i Nurmohamed 2012; Stajszyk i in. 2017).

Łuszczycowe zapalenie stawów (*psoriatic arthritis*, ŁZS) charakteryzuje się procesem zapalnym w obrębie stawów, z następczym uszkodzeniem ich struktur a także zapaleniem przyczepów ścięgniastych oraz towarzyszącą łuszczycą skóry. Szacuje się, że z ŁZS zmagają się około 5-20% pacjentów z łuszczycą. W przebiegu choroby występują liczne odstępstwa od klasycznych schematów a u większości chorych dochodzi do znacznego obniżenia jakości życia. Etiopatogeneza choroby nie jest do końca wyjaśniona, jednak kluczową rolę w jej rozwoju odgrywają czynniki genetyczne, immunologiczne i środowiskowe (Felis-Giemza 2017; van der Horst-Bruinsma i Nurmohamed 2012; Gossec 2016).

Zapalenia stawów w przebiegu zapalnych chorób jelit dotyczą około 10% pacjentów tej grupy schorzeń i prowadzą do rozwoju spondyloartropatii osiowej. Do IBD zalicza się: chorobę Leśniowskiego-Crohna (*Crohn disease*, CD) oraz wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*ulcerative colitis*, UC). Obraz kliniczny głównie manifestuje się obecnością nawracających biegunek, przewlekłych bóli brzucha, krwawieniem z odbytu, utrzymującą się gorączką oraz spadkiem masy ciała. Jednocześnie towarzyszą objawy kliniczne SpA. Etiopatogeneza IBD podobnie, jak w przypadku ŁZS jest wieloczynnikowa (Felis-Giemza 2017; Polińska i in. 2009).

2. Cytokiny prozapalne

Z chemicznego punktu widzenia cytokiny prozapalne są glikoproteinami o masie cząsteczkowej od kilku do kilkunastu kDa. Ich źródłem są zaktywowane komórki różnych tkanek na przykład komórki nabłonkowe przewodu pokarmowego, czy leukocyty. Do ich kluczowych zadań należy udział w procesach proliferacji i różnicowania się komórek organizmu oraz interakcje w odpowiedzi typu komórkowego lub humoralnego. Dodatkowo, cytokiny mogą uczestniczyć w procesach patologicznych lub wykazywać działanie cytotoksyczne. Wszystkie powyższe czynności mogą zostać wykonane dopiero, po wcześniejszej interakcji ligandów ze specyficznymi, bardzo czułymi receptorami zlokalizowanymi na powierzchni błon komórkowych. Cytokiny dzielą się na cytokiny o właściwościach prozapalnych oraz charakteryzujące się działaniem przeciwzapalnym. Dodatkowo, w nomenklaturze funkcjonuje podział w zależności od wydzielania przez konkretne populacje krwinek białych: na limfokiny oraz monokiny. Jednak najistotniejszym kryterium podziału cytokin, są zmiany strukturalne w ich cząsteczkach. Do głównych podgrup zalicza się: cytokiny hemopoetyczne, interferony, chemokiny, nadrodzinę czynnika martwicy nowotworu α (*tumor necrosis factor α* , TNF- α) a także interleukiny. Poszczególne cytokiny mogą wykazywać w stosunku do siebie antagonizm, czy też synergizm czynnościowy. Odnaczają się plejotropizmem lub działaniem w pętli sprzężeń zwrotnych a pełnione przez nie funkcje stanowią ważne elementy w wewnątrzkomórkowej sieci sygnałowej, wpływając na regulację ekspresji niektórych genów. Dodatkowo, z uwagi na silną stymulację układu immunologicznego, stały się one ważnym ogniwem w poszukiwaniu nowych możliwości terapeutycznych (Polińska i in. 2009).

3. Rodzina interleukiny 17

Interleukiny (IL) stanowią grupę cytokin, których główną funkcją jest udział w szlakach sygnalizacyjnych pomiędzy leukocytami, które umożliwiają ich wzajemną komunikację (Semik-Orzech i in. 2006). W przebiegu wybranych spondyloartropatii zapalnych, ich główną rolą jest zaangażowanie w mechanizmy biorące udział w indukcji procesu zapalnego oraz manifestację stanu klinicznego pacjenta (Stajszyk i in. 2017).

Cytokiny należące do rodziny interleukiny 17 (IL-17) stanowią cząsteczki prozapalne charakteryzujące się plejotropowym działaniem, produkowane w głównej mierze przez zaktywowane limfocyty T pamięci: populację komórek pomocniczych Th o fenotypie CD4+ oraz cytotoksycznych Tc CD8+. Ich źródłem w mniejszym stopniu mogą być komórki NK (*Natural Killer*), limfocyty $\gamma\delta$, monocyty oraz granulocyty obojętnochłonne. W wyniku wytwarzania IL-17 przez neutofile dochodzi do wytworzenia pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego w trakcie reakcji zapalnej. Dodatkowo, komórki pomocnicze CD4+ są uważane za zasadnicze elementy strukturalne systemu

immunologicznego, ze względu na ich udział w koordynacji oraz ukierunkowywaniu reakcji odpornościowych. W 2003 roku opisane przez Aggarwala i wsp. komórki odznaczające się wysoką ekspresją wyżej wymienionej interleukiny nazwano Th17. Historia tej cytokiny sięga roku 1993, kiedy po raz pierwszy została ona sklonowana. Z chemicznego punktu widzenia jest to homodimeryczny polipeptyd o masie cząsteczkowej od 35 do 40 kDa. Struktura drugorzędowa cząsteczek należących do podklasy IL-17 jest zbliżona, zwłaszcza łańcuchy α . Trzeciorzędowa budowa przestrzenna opiera się na tak zwanym węźle cysteinowym, stąd początkowo była określana mianem CTLA-8 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-8*, antygen 8 limfocytów cytotoksycznych). W późniejszym czasie, odkryto następne cząsteczki należące do rodziny interleukiny 17, które zostały oznaczone kolejnymi literami od A do F (IL-17A-IL-17F). Dzięki wynikom przeprowadzonych badań przypisano im kluczową rolę w przebiegu odpowiedzi odpornościowej, zarówno przeciwko chorobotwórczym antygenom zewnątrzkomórkowym, jak i reakcjom autoimmunologicznym, które wcześniej związane były z limfocytami Th1 (Juszczak i Głabiński 2006; Paradowska i in. 2009; Kucharz i in. 2017; Zhang i in. 2011).

Cząsteczki cytokin z rodziny interleukiny 17 wiążą się ze swoistymi receptorami, zlokalizowanymi na monocytach, komórkach nabłonkowych, fibroblastach oraz komórkach śródbłonna. Receptory tworzą własną grupę: IL-17RA, IL-17RB/IL-25R, IL-17RC, IL-17RD/SEF, IL-17RE. W wyniku specyficznych reakcji ligandów ze swoistymi receptorami następuje nasilenie syntezy innych cząsteczek prozapalnych, również o charakterze cytokin takich jak: TNF- α , IL-6 lub chemokin CXC ELR (+). Następstwem produkcji wyżej wymienionych cząstek jest integralna kooperacja neutrofilii z limfocytami Th17, dzięki zdolności granulocytów obojętnochłonnych do chemotaksji. Przykład stanowiąc mogą neutrofile zaangażowane w komórkową odpowiedź immunologiczną w przebiegu zakażenia *Klebsiella pneumoniae* lub *Candida albicans* zależne są od IL-17. Dlatego uważa się, że reakcje autoimmunologiczne prowadzące do rozwoju chorób z autoagresji, również zachodzą w wyniku ścisłej współpracy granulocytów obojętnochłonnych oraz limfocytów Th17 (Kucharz i in. 2017; Zhang i in. 2011; Juszczak i Głabiński 2006; Conti i in. 2009).

Do czynników stymulujących produkcję interleukiny 17 przez limfocyty Th17 należą osteopontyna, czyli białko uczestniczące w przemianach materii tkanki kostnej. Ponadto, silnym stymulatorem syntezy IL-17 jest interleukina-23 (IL-23), należąca do rodziny IL-12 a także produkt metabolizmu kwasu arachidonowego jakim jest prostaglandyna E₂ (PGE₂). W wyniku jednoczesnego działania z IL-23 dochodzi do wzrostu aktywności transkrypcyjnej czynnika ROR γ t (*retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma*), co powoduje dojrzewanie subpopulacji limfocytów pomocniczych i produkcję IL-17 (Juszczak i Głabiński 2006; Laurence i in. 2007).

Dodatkowo, aktywność transkrypcyjna IL-17 w dużym stopniu uzależniona jest od receptorów chemokinowych CCR6 obecnych na powierzchni komórek Th17. Swoistym ligandem danych receptorów jest chemokina CCL20, pod wpływem której limfocyty T, B oraz komórki dendrytyczne odznaczają się zdolnościami migracji do toczących się w obrębie zapalenia ognisk. Ponadto, w wyniku równoczesnego działania IL-6 wraz z TGF- β (transformujący czynnik wzrostu β , *transforming growth factor β*) następuje wzmocnienie autokrynnej sekrecji cząsteczek CCL20. Do innych chemokin, których produkcja jest zwiększona pod wpływem IL-17 należą: IL-8/CXCL8 oraz CCL2. Cząsteczki te, umożliwiają napływ neutrofilii oraz makrofagów do zmienionej chorobowo błony maziowej struktur stawowych (Juszczak i Głabiński 2006; Kucharz i in. 2017).

Jednym z elementów blokujących uwalnianie IL-17 przez komórki Th17 jest interleukina 2 (IL-2), której mechanizm działania opiera się na regulacji czynnika transkrypcyjnego STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*). Dochodzi do promowania apoptozy wśród komórek populacji limfocytów Th17 oraz następczego wzrostu liczebności komórek regulatorowych Treg. W konsekwencji dochodzi do zahamowania odpowiedzi układu odpornościowego zależnej od Th17 (Juszczak i Głabiński 2006; Laurence i in. 2007).

Szczególą rolę odgrywa interleukina 17A (IL-17A), uważana za prototypową cząsteczkę tej grupy, która składa się z 177 reszt aminokwasowych. Koniec aminowy N- łańcucha polipeptydowego zaopatrzony jest w sekwencję sygnałową a także w grupy węglowodanowe przyłączone przy pomocy wiązań N-glikozydowych oraz reszty cysteinowej. Cząstka ta uczestniczy

w sposób pośredni w interakcji pomiędzy limfocytami T a neutrofilami znajdującymi się w ogniskach zapalnych. Związane jest to ze zdolnością IL-17A do produkcji czynników chemotaktycznych np. chemokin CXCL1, czy też czynników wzrostu takich jak: G-CSF lub GM-CSF (Semik-Orzech i in. 2006; Stajszczyk i in. 2017). Dzięki obecności powyższych związków granulocyty obojętnochłonne wykazują zdolność do podziałów komórkowych a następnie do różnicowania. Dodatkowo, IL-17A wraz z IL-23 charakteryzują się supresyjnym działaniem w stosunku do komórek Th1 (Juszczak i Głąbiński 2006).

Interleukina 17F (IL-17F) stanowi również ważny element czynnościowy w przebiegu odpowiedzi immunologicznej. Uczestniczy w reakcjach skierowanych przeciwko patogenom, jak i własnym elementom strukturalnym ustroju, przyczyniając się do rozwoju patologicznych procesów z autoagresji. Charakteryzuje się ona także największą homologią strukturalną (około 50%) z cząsteczką IL-17A (Juszczak i Głąbiński 2006; Kucharz i in. 2017).

Interleukina 17E (IL-17E) określana również mianem IL-25 cechuje się antagonizmem czynnościowym w stosunku do innych cząsteczek należących do rodziny IL-17. W wyniku inhibicji dojrzewania limfocytów Th17 oraz procesu namnażania się komórek, stanowi ważne ogniwo w grupie czynników hamujących odpowiedź immunologiczną. Jednocześnie odgrywa istotną rolę w stymulacji odpowiedzi Th2-zależnej (Juszczak i Głąbiński 2006).

W przebiegu łuszczykowego zapalenia stawów IL-17A uczestniczy w pobudzaniu aktywności metaloproteinaz, uszkadzających struktury stawowe, co prowadzi do dysfunkcji aparatu ruchu. Zmiany kliniczne w skórze mediowane są przez IL-17, która pośredniczy w aktywności transkrypcyjnej IL-22. W wyniku współdziałania obu cząsteczek dochodzi do ekspresji genów kodujących skórne peptydy przeciwbakteryjne takie jak: α -defenzyny-2, czy kalprotektyny. Dzięki obecności powyższych elementów rozwijają się zmiany chorobowe w obrębie skóry i paznokci, jak również następuje spadek tolerancji immunologicznej. Prowadzi to do powstawania autoreaktywnych limfocytów Th17 skierowanych przeciwko elementom strukturalnym ustroju (autoantygeny). Dodatkowo, IL-17 wraz z IFN- γ (interferon γ) i IL-22 bierze udział w ekspresji mRNA keratyny K17 oraz regulacji stężenia tego białka w komórkach naskórka przez pobudzenie szlaku JAK-STAT. Na skutek prawidłowo dobranej terapii aktywność transkrypcyjna tego białka zanika. Ponadto, wzrost stężenia IL-17 oraz IL-23 koreluje dodatnio z nasileniem zmian chorobowych w przebiegu ŁZS (Kucharz i in. 2017).

W przypadku spondyloartropatii w przebiegu nieswoistych chorób zapalnych jelit, obserwuje się wzrost stężenia IL-17 w surowicy krwi oraz błonie śluzowej jelit chorych. Dodatkowo, pod wpływem uszkodzenia śluzówki, dochodzi do wzrostu stężenia IL-17 lokalnie w kale, zwłaszcza w aktywnej postaci choroby Leśniowskiego-Crohna. Niektóre wyniki badań sugerują, że w przypadku wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, obserwuje się wzrost ekspresji mRNA IL-17 w błonie śluzowej jelit, przy jednoczesnym braku aktywności transkrypcyjnej u ludzi zdrowych. Populacja komórek Th17 charakteryzuje się również większą liczebnością w aktywnym stadium IBD, w związku z toczącym się procesem zapalnym w obrębie jelit oraz indukcją innych prozapalnych cząsteczek takich jak: IL-1 β oraz TNF- α , natomiast w okresie remisji choroby odnotowany jest ich spadek (Felis-Giemza 2017; Polińska i in. 2009; Fujino i in. 2003).

4. Leczenie biologiczne

Kluczowym zadaniem terapii w przebiegu spondyloartropatii zapalnych jest poprawa jakości życia pacjentów. Stan ten, możliwy jest do osiągnięcia poprzez wprowadzenie regularnych kontroli aktywności choroby, ograniczenie dalszego rozwoju a także dbanie o prawidłowy stan psychiczny chorych. Dodatkowo, ważną rolę w monitorowaniu przebiegu choroby odgrywają badania dodatkowe, takie jak badania laboratoryjne oraz obrazowe (Felis-Giemza 2017).

Główne założenia oraz możliwości terapeutyczne w przypadku SpA są reprezentowane przez *Assessment in Ankylosing Spondylitis International Society-European League Against Rheumatism* (ASAS-EULAR), kładąc szczególny nacisk na wielospecjalistyczne podejście do występujących dysfunkcji. Ważną rolę odrywa wskaźnik *Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score* (ASDAS), łączący w sobie obserwację dynamiki choroby wraz z kontrolą markeru stanu

zapalnego - białka C reaktywnego (CRP) a także ocenę reakcji na wprowadzone leczenie farmakologiczne (Felis-Giemza 2017; van der Heijde i in. 2017; Gossec i in. 2016).

Wyróżnia się tutaj leczenie nefarmakologiczne oraz farmakologiczne. Jedną z nefarmakologicznych możliwości terapeutycznych jest fizykoterapia. Dodatkowo, wprowadzenie zrównoważonej diety oraz zaprzestanie palenia papierosów, znacząco wpływa na polepszenie stanu zdrowia pacjentów z SpA. W przypadku farmakologii, lekami pierwszego rzutu są niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ). Istnieją możliwości włączenia leków przeciwbólowych takich jak paracetamol lub opioidy. Jednak, u pacjentów charakteryzujących się ciężkim przebiegiem choroby, mimo stosowanej terapii w postaci: przynajmniej 2 leków z grupy NLPZ przez okres co najmniej 4 tygodni należy rozważyć włączenie terapii biologicznej (Felis-Giemza 2017).

Jedną z grup leków biologicznych, stosowanych w przypadku SpA są inhibitory IL-17. Przykładem substancji czynnej jest sekukinumab (nazwa handlowa preparatu *Cosentyx*). Nie może on być jednak stosowany u chorych z aktywną postacią zapalenia w obrębie jelit. Dlatego pacjenci cierpiący na SpA w przebiegu zapalnych chorób jelit w głównej mierze korzystają z możliwości terapeutycznych leków z grupy anty-TNF- α (Felis-Giemza 2017; Kucharz i in. 2017).

Sekukinumab to ludzkie przeciwciało monoklonalne klasy G1 z łańcuchami lekkimi klasy kappa, skierowane przeciwko IL-17A. W wyniku jego działania dochodzi do zmniejszenia stężenia aktywnej postaci IL-17A w ustroju pacjenta. Obecnie, stosowany jest głównie w następujących jednostkach chorobowych: łuszczycy, zeszywniającym zapaleniu stawów kręgosłupa oraz ŁZS. W dalszym ciągu trwają badania w celu wprowadzenia terapii przy pomocy wyżej wymienionej substancji w reumatoidalnym zapaleniu stawów, chorobie Behceta, czy też zespołach autozapalnych (Felis-Giemza 2017; Stajszczyk i in. 2017; Speeckaert i in. 2016).

W przypadku łuszczycowego zapalenia stawów sekukinumab stosowany jest w trzeciej fazie terapii. Oznacza to, że zostaje on wprowadzony do leczenia w momencie braku skuteczności terapeutycznej metotreksatu, czy też innych grup leków biologicznych. W przypadku osiowej postaci SpA z towarzyszącą minimalną odpowiedzią organizmu na NLPZ. Dodatkowo, w celu utrzymania remisji oraz zapobiegania nawrotom choroby można zastosować leki biologiczne w zmniejszonych dawkach (Kucharz i in. 2017; Coates i in. 2016).

O skuteczności terapii oraz jednoczesnym bezpieczeństwie stosowania sekukinumabu świadczą wyniki przeprowadzonych badań klinicznych, prezentowane przez ekspertów Polskiego Towarzystwa Reumatologicznego i Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego. Grupę pacjentów z aktywną postacią łuszczycowego zapalenia stawów (każdy podtyp choroby), która wzięła udział w badaniach stanowiły 1003 osoby, które nie reagowały na leki typu NLPZ, glikokortykosteroidy, czy też inne syntetyczne leki modyfikujące przebieg ŁZS. Już w pierwszym tygodniu odnotowano redukcję nasilenia bólu stawów. Po trzech tygodniach terapii zaobserwowano istotną statystycznie zmianę wskaźników aktywności choroby wśród grupy pacjentów otrzymujących lek, w stosunku do chorych otrzymujących placebo. Szczególnie ważną informacją jest to, że w trakcie leczenia sekukinumabem nie zaobserwowano wśród wybranej grupy chorych progresji zmian chorobowych. Dodatkowo, nastąpiło polepszenie jakości ich życia. Do głównych działań niepożądanych stosowanego leku należą: zapalenie nosa, gardła oraz nieżyt nosa. Większość z nich charakteryzuje się łagodną lub umiarkowaną intensyfikacją. Dodatkowo, mniej niż 1% pacjentów wytworzyło przeciwciała skierowane przeciwko cząsteczkom leku w czasie około 3 lat od rozpoczęcia terapii. Były to przeciwciała neutralizujące, aczkolwiek proces ten nie wpłynął negatywnie na skuteczność oraz reakcje farmakokinetyczne leku (Kucharz i in. 2017; Kavanaugh i in. 2016).

5. Podsumowanie

Podsumowując, SpA to grupa ciężkich w przebiegu schorzeń, których wspólną cechą jest zajęcie stawów kręgosłupa w trakcie toczącego się procesu zapalnego. Ich obraz kliniczny jest różnorodny i zależy od konkretnej jednostki chorobowej. Etiologia jest wieloczynnikowa, jednak ważną rolę w powstawaniu SpA odgrywają czynniki immunologiczne m.in. IL-17. Cytokiny z rodziny IL-17 odznaczają się zdolnością do uruchomienia oraz podtrzymywania reakcji zapalnej, dlatego też pełnią kluczową rolę w przebiegu SpA. Leczenie SpA charakteryzuje się kompleksowym podejściem do chorych, gdzie istotną rolę odgrywa farmakoterapia. Jedną z nowych możliwości

terapeutycznych są leki biologiczne a swoistym lekiem skierowanym przeciwko IL-17 jest sekukinumab. Wprowadzenie go wymaga wcześniejszego zaznajomienia się z mechanizmem działania, poznaniem dynamiki rozwoju choroby oraz z aktualnym stanem klinicznym pacjenta. Decyzję o zastosowaniu leku anty-IL-17 należy podejmować w każdym przypadku indywidualnie.

6. Literatura

- Coates LC, Kavanaugh A, Mease PJ et al. (2016) Group for Research and Assessment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis 2015 Treatment Recommendations for Psoriatic Arthritis. *Arthritis & Rheumatology* 68 (5): 1060–1071.
- Conti HR, Shen F, Nayyar N et al. (2009) Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *Journal of Experimental Medicine* 206: 299–311.
- Felis-Giemza A (2017) Spondyloartropatia a zmiany narządowe-kompleksowe podejście do pacjenta. *Forum Reumatologiczne* 3 (3): 160-167.
- Fujino S, Andoh A, Bamba S et al. (2003) Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 5: 65–70.
- Gossec L, Smolen JS, Ramiro S et al. (2016) European League Against Rheumatism (EULAR) recommendations for the management of psoriatic arthritis with pharmacological therapies: 2015 update. *Annals of the Rheumatic Diseases* 75: 499-510.
- Juszczak M, Głabiński A (2009) Udział limfocytów Th17 w patogenezie stwardnienia rozsianego. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 63: 492-501.
- Kavanaugh A, Mease PJ, Reimold AM et al. (2017) Secukinumab for Long-Term Treatment of Psoriatic Arthritis: A Two-Year Followup From a Phase III, Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Arthritis Care & Research* 69 (3): 347–355.
- Kucharz EJ, Stajszczyk M, Batko B i in. (2017) Zastosowanie sekukinumabu w leczeniu chorych na łuszczycowe zapalenie stawów-stanowisko ekspertów Polskiego Towarzystwa Reumatologicznego i Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego. *Forum Reumatologiczne* 3 (2): 119-125.
- Laurence A, Tato CM, Davidson TS et al. (2007) Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 26: 371–381.
- Paradowska A, Masliniski W, Grzybowska-Kowalczyk A et al. (2007) The function of interleukin 17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 55: 329–334.
- Polińska B, Matowicka-Karna J, Kemon H (2009) Cytokiny w nieswoistych zapalnych chorobach jelit. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 63: 389-394.
- Semik-Orzech A, Barczyk A, Pierzchała W (2006) Rola cytokin z rodziny interleukiny 17 w rozwoju alergicznej reakcji zapalnej w układzie oddechowym. *Pneumologia i Alergologia Polska* 74: 409-413.
- Speeckaert R, van Geel N, Lambert J et al. (2016) Secukinumab: IL-17A inhibition to treat psoriatic arthritis. *Drugs of Today* 52 (11): 607–616.
- Stajszczyk M, Kucharz EJ, Batko B i in. (2017) Sekukinumab w leczeniu pacjentów z osiową spondyloartropatią-stanowisko ekspertów Polskiego Towarzystwa Reumatologicznego. *Forum Reumatologiczne* 3 (2): 110-116.
- van der Heijde D, Ramiro S, Landewe R et al. (2017) 2016 Update of the ASAS-EULAR management recommendations for axial spondyloarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 76: 978-991.
- van der Horst-Bruinsma IE, Nurmohamed MT (2012) Management and evaluation of extra-articular manifestations in spondyloarthritis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 4: 413-422.
- Zhang X, Angkasekwinai P, Dong C et al. (2011) Structure and function of interleukin-17 family cytokines. *Protein & Cell* 2 (1): 26–40.

19. Wpływ glikacji na właściwości wiążące albuminy w aspekcie tworzenia kompleksu z acetoheksamidem

The effect of glycation on the binding properties in terms of complex formation with acetoheksamidem

Szkudlarek Agnieszka, Rogóż Wojciech, Maciążek-Jurczyk Małgorzata

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej Wydziału Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Agnieszka Szkudlarek: aszkudlarek@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: glikowana albumina surowicy krwi ludzkiej, metoda wygaszania fluorescencji, dokowanie molekularne

Streszczenie

Pęd życia, niewłaściwe nawyki żywieniowe oraz zredukowanie aktywności fizycznej do całkowitego minimum spowodowały eksplozję liczby zachorowań na cukrzycę na całym świecie. Uważana za „epidemię XXI-wieku” stanowi wciąż wyzwanie dla współczesnej medycyny. Ta przewlekła choroba o charakterze cywilizacyjnym związana jest z zaburzeniami mechanizmów regulujących poziom glukozy we krwi. Badacze są zgodni, że powikłania oraz postęp choroby mają ścisły związek z toksycznym działaniem glukozy oraz jej metabolitów, jako jednego z patogennych czynników. U pacjentów z podwyższonym stężeniem m.in. glukozy we krwi dochodzi do nasilenia procesu glikacji, obejmującego także albuminę surowicy krwi (HSA). Podczas utrzymującego się w organizmie stanu hiperglikemii powstają końcowe produkty zaawansowanej glikacji (AGEs), które są odpowiedzialne za liczne patologie tkankowe i narządowe. Wiadomym jest, że albumina wiążąc leki wpływa na ich biologiczną dostępność, dystrybucję, właściwości farmakokinetyczne i farmakodynamiczne. Wszelkie modyfikacje w obrębie HSA są przyczyną utraty jej pierwotnych właściwości oraz pełnionych przez nią funkcji fizjologicznych. W związku z tym, celem przedstawionej pracy było zbadanie powinowactwa acetoheksamidu (AH), wybranego leku przeciwcukrzycowego, do modyfikowanej glukozą, fruktozą i galaktozą ludzkiej albuminy surowicy krwi (gHSA_{GLC}, gHSA_{FRC}, gHSA_{GAL}) metodą wygaszania fluorescencji. Ponadto, porównano teoretyczny model wiązania acetoheksamidu do albuminy natywnej (HSA), skompleksowanej z glukozą (GLC-HSA) i fruktozą (FRC-HSA), otrzymany na podstawie komputerowego dokowania molekularnego z wynikami uzyskanymi doświadczalnie.

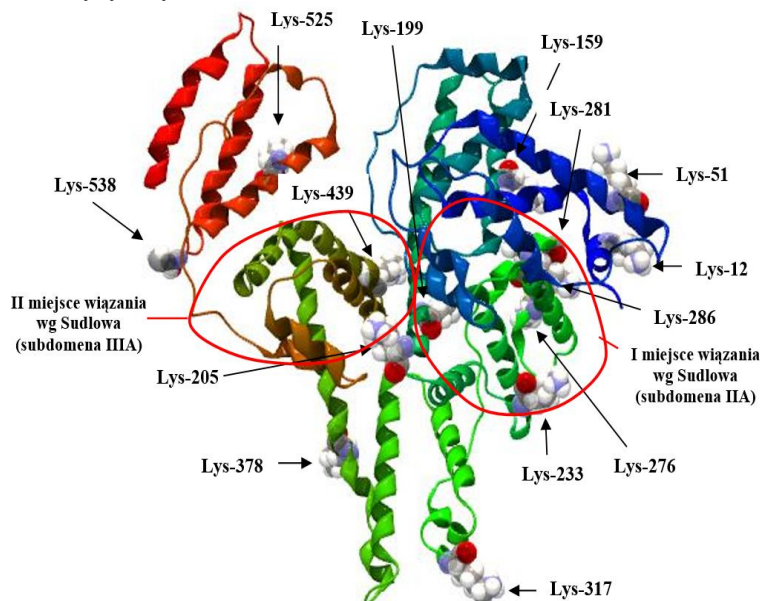
1. Wstęp

Albumina jest najliczniej występującym białkiem surowicy krwi (ang. *Human Serum Albumin*, HSA), gdzie jej stężenie sięga 40-50 g/l, stanowiąc 55-65% wszystkich protein obecnych w osoczu (Artali et al. 2005). HSA pełni ważną rolę w procesie dystrybucji do tkanek docelowych wielu związków biologicznie czynnych przez odwracalne wiązanie substancji endo- i egzogennych (Carter i He 1990). Transport ligandów w kompleksie z albuminą objawia się wzrostem rozpuszczalności tych związków w surowicy, zmniejszeniem ich toksyczności oraz ochroną przed utlenianiem. Mechanizm i siła wiązania leku z makrocząsteczką zależy od właściwości fizykochemicznych i stężenia danego leku, zdolności wiążących albuminy, a także wpływu środowiska. Lek, który tworzy kompleks z albuminą stanowi pulę zapasową, która jest nieczynna farmakologicznie, ponieważ za działanie terapeutyczne farmaceutyku odpowiedzialne są jego cząsteczki w stanie wolnym (Broderson et al. 1977).

Jedną z ważniejszych przemian biochemicznych, która wywołuje szereg zmian konformacyjnych w strukturze II- i III-rzędowej albuminy surowicy krwi, a tym samym wpływa na pełnione przez nią funkcje fizjologiczne, jest glikacja (reakcja *Maillarda*) (Rondeau i Bourdon 2011). Fizjologicznie proces ten zachodzi z niedużym natężeniem, zwiększając intensywność podczas stanów hiperglikemii oraz w przebiegu stanów zapalnych w następstwie zwiększonego stresu

oksydacyjnego. Glikacja zachodzi w warunkach *in vivo*, *in vitro* i podczas przetwarzania żywności (Zuwała-Jagiello 2009). W układach biologicznych proces glikacji obejmuje fazę początkową, etap pośredni oraz stadium późne (końcowe), podczas którego powstają stabilne, końcowe produkty zaawansowanej glikacji (ang. *Advanced Glycation-End Products*, AGEs) (Nawale et al. 2006). W stanach patologicznych m.in. w cukrzycy, większość AGEs pozostaje w organizmie i ulega akumulacji biorąc udział w etiopatogenezie miażdżycy, powikłań cukrzycowych, amyloidozy, choroby Alzheimera, β_2 mikroglobulinemii, katarakty, reumatoidalnego zapalenia stawów, marskości wątroby, mocznicy, zwłóknienia płuc oraz przedwczesnego starzenia się organizmu (Ahmed i Thornalley 2007; Zhang et al. 2009).

Na Rys.1 przedstawiono specyficzne miejsca wiązania ligandów w strukturze ludzkiej albuminy surowicy krwi (tj. I i II miejsce według Sudlowa) z rozmieszczeniem głównych miejsc glikacji *in vivo* HSA – reszt lizynowych (Szkudlarek et al. 2019).



Rys.1 Miejsca glikacji *in vivo* w strukturze HSA dla reszt lizyny (Lys).

Celem przedstawionej pracy było zbadanie powinowactwa acetoheksamidu (AH) – wybranego leku hipoglikemizującego, pochodnej sulfonilomocznika I generacji – do glikowanej ludzkiej albuminy surowicy krwi glukozą, fruktozą i galaktozą (gHSA_{GLC}, gHSA_{FRC}, gHSA_{GAL}) metodą wygaszania fluorescencji. Porównano także teoretyczny model wiązania AH do albuminy natywnej (HSA), skompleksowanej z glukozą (GLC-HSA) i fruktozą (FRC-HSA), otrzymany na podstawie komputerowego dokowania molekularnego z wynikami otrzymanymi doświadczalnie. Ocena właściwości wiążących glikowanej albuminy może pomóc w planowaniu terapii pacjentów cierpiących na cukrzycę i jej powikłania oraz pacjentów w podeszłym wieku.

2. Materiał i metody

W badaniu użyto: albuminę surowicy krwi ludzkiej nasyconej kwasami tłuszczowymi (HSA) frakcja V (MP BiomedicalsTM Inc, LLC, Francja), acetoheksamid (AH) (Sigma-Aldrich Chemistry, Chiny), D(+)-glukozę (GLC), D(-)-fruktozę (FRC), D(+)-galaktozę (GAL), Tris (hydroksymetylo)aminometan (TRIS), kwas solny (chlorowodorowy) (0.1 mol/dm³, HCl) (POCH S.A., Polska), azydek sodu (Sigma-Aldrich Chemistry, Niemcy), metanol do badań spektroskopowych (Merck KGaA, Niemcy).

Glikowaną ludzką albuminę surowicy krwi (gHSA_{GLC}, gHSA_{FRC}, gHSA_{GAL}) otrzymano po 21 dniach inkubacji (t = 37°C) HSA odpowiednio z glukozą (GLC), fruktozą (FRC) i galaktozą

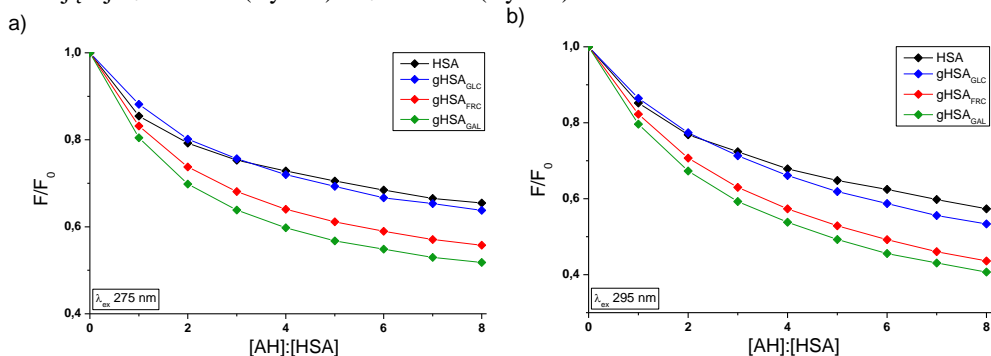
(GAL). Pomiary fluorescencyjne przeprowadzono spektrofлуorymetrem JASCO FP-6500. Analizę oddziaływania AH z niemodyfikowaną (HSA) i glikowaną (gHSA_{GLC}, gHSA_{FRC}, gHSA_{GAL}) albuminą przeprowadzono techniką wygaszania fluorescencji makrocząsteczki. Ze względu na występowanie efektu wewnętrznego filtra (*inner filter effect*) rejestrowaną fluorescencję HSA, gHSA_{GLC}, gHSA_{FRC}, gHSA_{GAL}, bez i w obecności AH korygowano za pomocą wzoru przedstawionego przez Lakowicza (Lakowicz 2006). Pomiary absorpcyjne wykonano na spektrofotometrze dwuwiaźkowym firmy JASCO (model V-760).

Na podstawie wyznaczonych intensywności fluorescencji układu acetoheksamid-albumina wykreślono krzywe wygaszania fluorescencji HSA, gHSA_{GLC}, gHSA_{FRC} i gHSA_{GAL} przez AH. Przebieg krzywych Sterna-Volmera (zależność F_0/F od stężenia leku) pozwolił wnioskować o mechanizmie wygaszania fluorescencji fluoroforów HSA przez badany lek (Grigoryan i Ghazaryan 2013). Ze zmodyfikowanej zależności Sterna-Volmera ($F_0/\Delta F = f(1/[C_{AH}])$) wyznaczono stałą Sterna-Volmera K_{SV} w układzie AH-HSA, AH-gHSA_{GLC}, AH-gHSA_{FRC}, AH-gHSA_{GAL} i ułamek maksymalnej fluorescencji białka dostępnej dla wygaszacza (f_a) (Eftink i Ghiron 1981). W analizie ilościowej powinowactwa acetoheksamidu do ludzkiej albuminy surowicy krwi zastosowano równanie Scatcharda ($r/[L_f] = f(r)$) (Hiratsuka 1990) i izotermy wiązania ($r = f(L_f)$) (Taira i Terada 1985), za pomocą których wyznaczono stałe asocjacji K_a oraz liczbę cząsteczek leku wiążących się z jedną cząsteczką albuminy w stanie równowagi (n).

Dla wskazania potencjalnego miejsca wiązania acetoheksamidu oraz powinowactwa wiązania (ang. *binding affinity*) AH do natywnej (HSA), skompleksowanej z glukozą (GLC-HSA) i fruktozą (FRC-HSA) ludzkiej albuminy surowicy krwi przeprowadzono symulację dokowania molekularnego za pomocą programu CLC Drug Discovery Workbench ver. 1.0.2. [Nr licencji: CLC-LICENSE-51JT8-DXYBY-2A3EW-ED80P-DGW80]. W symulacji komputerowej wykorzystano ustaloną krystalograficznie strukturę albuminy HSA, (GLC-HSA) i (FRC-HSA) pobraną z bazy danych struktur białkowych PDB (ang. *Protein Data Bank*). Struktury białek wczytano do programu CLC Drug Discovery Workbench ver. 1.0.2 za pomocą kodu PDB ID: 4K2C (dla HSA), 4IW2 (dla GLC-HSA), 4IW1 (dla FRC-HSA), a następnie rozpoczęto procedurę dokowania molekularnego AH do cząsteczek makromolekuł. Jako wynik dokowania otrzymano wartości liczbowe energii wiązania przyporządkowane kompleksom lek-albumina.

3. Wyniki i dyskusja

Na podstawie emisyjnych widm fluorescencyjnych niemodyfikowanej (HSA) i glikowanej (gHSA_{GLC}, gHSA_{FRC}, gHSA_{GAL}) albuminy wykreślono krzywe wygaszania fluorescencji makrocząsteczek (zależność $F/F_0 = f([AH]:[HSA])$) o stężeniu 5×10^{-6} mol/dm³ w obecności acetoheksamidu (AH) o wzrastającym stężeniu, dla obu stosowanych w doświadczeniu długości fali wzbudzającej λ_{ex} 275 nm (Rys.2a) i λ_{ex} 295 nm (Rys.2b).



Rys.2 Krzywe wygaszania fluorescencji HSA (◆), gHSA_{GLC} (◆), gHSA_{FRC} (◆), gHSA_{GAL} (◆) o stężeniu 5×10^{-6} mol/dm³ w obecności AH o stężeniach 5×10^{-6} mol/dm³ ÷ 4×10^{-5} mol/dm³, **a)** λ_{ex} 275 nm, **b)** λ_{ex} 295 nm.

Glikacja ludzkiej albuminy surowicy krwi wpływa na zdolność wygaszania fluorescencji HSA przez acetoheksamid. Dla białka modyfikowanego (gHSA_{GLC}, gHSA_{FRC}, gHSA_{GAL}) następuje silniejsze wygaszenie fluorescencji niż dla HSA niemodyfikowanej (Rys.2). Silniejsze wygaszenie fluorescencji gHSA_{GLC}, gHSA_{FRC}, gHSA_{GAL} świadczy o większej zdolności przejmowania energii przez AH od wzbudzonych fluoroforów albuminy glikowanej niż HSA niemodyfikowanej, co ma związek ze zmniejszeniem odległości między fluoroforem i lekiem wskutek zmian strukturalnych albuminy.

Tab.1. Położenie maksimum emisji fluorescencji λ_{\max} oraz ich przesunięcia $\Delta\lambda_{\max}$ dla układu AH-HSA, AH-gHSA_{GLC}, AH-gHSA_{FRC}, AH-gHSA_{GAL}, λ_{ex} 275 nm i λ_{ex} 295 nm.

	AH-HSA		AH-gHSA _{GLC}		AH-gHSA _{FRC}		AH-gHSA _{GAL}	
	λ_{ex} 275nm	λ_{ex} 295nm	λ_{ex} 275nm	λ_{ex} 295nm	λ_{ex} 275nm	λ_{ex} 295nm	λ_{ex} 275nm	λ_{ex} 295nm
λ_{\max} [nm]	328±321	336±333	327÷318	336÷333	326÷316	336÷333	329÷316	336÷333
$\Delta\lambda_{\max}$	- 7 nm	- 3 nm	- 9 nm	- 3 nm	- 10 nm	- 3 nm	- 13 nm	- 3 nm

(-) oznacza przesunięcie krótkofalowe pasma

We wszystkich badanych układach AH-HSA, AH-gHSA_{GLC}, AH-gHSA_{FRC} i AH-gHSA_{GAL} w miarę wzrostu stężenia leku nastąpiło przesunięcie pasma emisji fluorescencji ($\Delta\lambda_{\max}$) w kierunku krótkofalowym względem maksimum emisji fluorescencji niezwiązanej albuminy. Przesunięcie hipsochromowe większe po wzbudzeniu fluorescencji albuminy długością fali λ_{ex} 275 nm niż długością λ_{ex} 295 nm oznacza, że nie tylko wokół Trp-214, ale również wokół reszt tyrozylowych rozmieszczonych w subdomenie IIA (Tyr-263), IB (Tyr-138, Tyr-140, Tyr-148, Tyr-150, Tyr-161), IIB (Tyr-319, Tyr-332, Tyr-334, Tyr-341, Tyr-353, Tyr-370) oraz IIIA (Tyr-401, Tyr-411, Tyr-452, Tyr-497) otoczenie staje się mniej polarne. Silniejsze przesunięcie $\Delta\lambda_{\max}$ w kierunku „blue” powodowane rosnącym stężeniem leku w układzie AH-albumina o 2 nm dla gHSA_{GLC}, 3 nm dla gHSA_{FRC} i 6 nm dla gHSA_{GAL}, w porównaniu do niemodyfikowanej HSA ($\Delta\lambda_{\max} = -7$ nm) (Tab.1) świadczyć może o wzroście charakteru hydrofobowego otoczenia reszty tryptofanowej i/lub reszt tyrozylowych albuminy po glikacji.

Ujemne odchylenie krzywych Sterna-Volmera od prostoliniowej zależności $F_0/F = f[C_{\text{AH}}]$ dla AH-HSA, AH-gHSA_{GLC}, AH-gHSA_{FRC} i AH-gHSA_{GAL} (danych nie pokazano), wskazuje na złożony mechanizm wygaszania fluorescencji niemodyfikowanej i glikowanej HSA przez acetoheksamid, w którym obok wygaszania kolizyjnego, występuje również wygaszanie statyczne (formowanie się trwałego kompleksu lek-albumina w stanie podstawowym). Zgodnie z teorią Eftinka i Ghirona świadczy to o zajmowaniu przez AH w pierwszej kolejności łatwo dostępnych miejsc wiązania, a dopiero po ich nasyceniu pozostałych miejsc w makrocząsteczce (Eftink i Ghiron 1981; Grigoryan i Ghazaryan 2013).

Tab.2 Wartości K_{SV} [dm³mol⁻¹] oraz dostępność fluoroforów (f_a) dla układu AH-HSA, AH-gHSA_{GLC}, AH-gHSA_{FRC} i AH-gHSA_{GAL}, λ_{ex} 275 nm i λ_{ex} 295 nm.

	AH-HSA		AH-gHSA _{GLC}		AH-gHSA _{FRC}		AH-gHSA _{GAL}	
	λ_{ex} 275nm	λ_{ex} 295nm	λ_{ex} 275nm	λ_{ex} 295nm	λ_{ex} 275nm	λ_{ex} 295nm	λ_{ex} 275nm	λ_{ex} 295nm
$K_{\text{SV}} \times 10^4$ ± SE ^{*)} [dm ³ mol ⁻¹]	10.89 ± 0.27	7.38 ± 0.16	6.01 ± 0.10	4.78 ± 0.06	8.24 ± 0.05	5.59 ± 0.04	9.31 ± 0.06	6.68 ± 0.05
f_a ± SE ^{*)}	0.41 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.70 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.81 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.81 ± 0.01

^{*)} niepewność pomiarowa

Większe wartości stałej Sterna-Volmera K_{SV} otrzymane dla kompleksu AH-HSA w porównaniu ze stałymi K_{SV} otrzymanymi dla AH-gHSA_{GLC}, AH-gHSA_{FRC} i AH-gHSA_{GAL} (Tab.2) wskazują o lokowaniu się cząsteczek acetoheksamidu bliżej fluoroforów niemodyfikowanej

albuminy niż fluoroforów albuminy glikowanej. Wzbudzając fluorescencję albuminy długością fali λ_{ex} 275 nm zaobserwowano emisję promieniowania pochodzącego nie tylko od reszty tryptofanu, ale również od reszt tyrozylowych. Gdy fluorescencję białek wzbudzano falą o długości λ_{ex} 275 nm, otrzymano większe wartości stałych K_{SV} dla wszystkich analizowanych układów, niż po wzbudzeniu promieniowaniem λ_{ex} 295 nm. Świadczy to o udziale reszt tyrozylowych niemodyfikowanej i glikowanej HSA w oddziaływaniu acetoheksamid-albumina. Subdomena IIA ludzkiej albuminy surowicy krwi zawiera tylko jedną resztę tryptofanową (Trp-214) i tyrozylową (Tyr-263), co wskazywałoby, iż w wiązaniu acetoheksamidu do albuminy biorą udział również inne subdomeny struktury III-rzędowej białka bogate w reszty Tyr (subdomena IB, IIB i IIIA). Joseph i wsp. dowiedli za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii powinowactwa (HPAC), że acetoheksamid wiąże się do glikowanej ludzkiej albuminy surowicy krwi zarówno w I (subdomena IIA), jak i II (subdomena IIIA) miejscu wiązania ligandów według Sudlowa (Joseph et al. 2010). Jako, że wartości stałej K_{SV} i frakcji f_a są odwrotnie proporcjonalne, zmniejszeniu K_{SV} towarzyszy wzrost f_a . Zaobserwowano, że glikacja zmniejsza siłę oddziaływania AH z fluoroforami albuminy i równocześnie zwiększa dostępność (f_a) AH do reszty tryptofanowej i reszt tyrozylowych HSA (Tab.2).

Skoro AH wysyca miejsca wiązania niemodyfikowanej i glikowanej HSA, korzystając z równania Scatcharda i izoterm wiązania wyznaczono stałe asocjacji K_a , które określają stabilność utworzonego kompleksu ligand-białko (Tab.3).

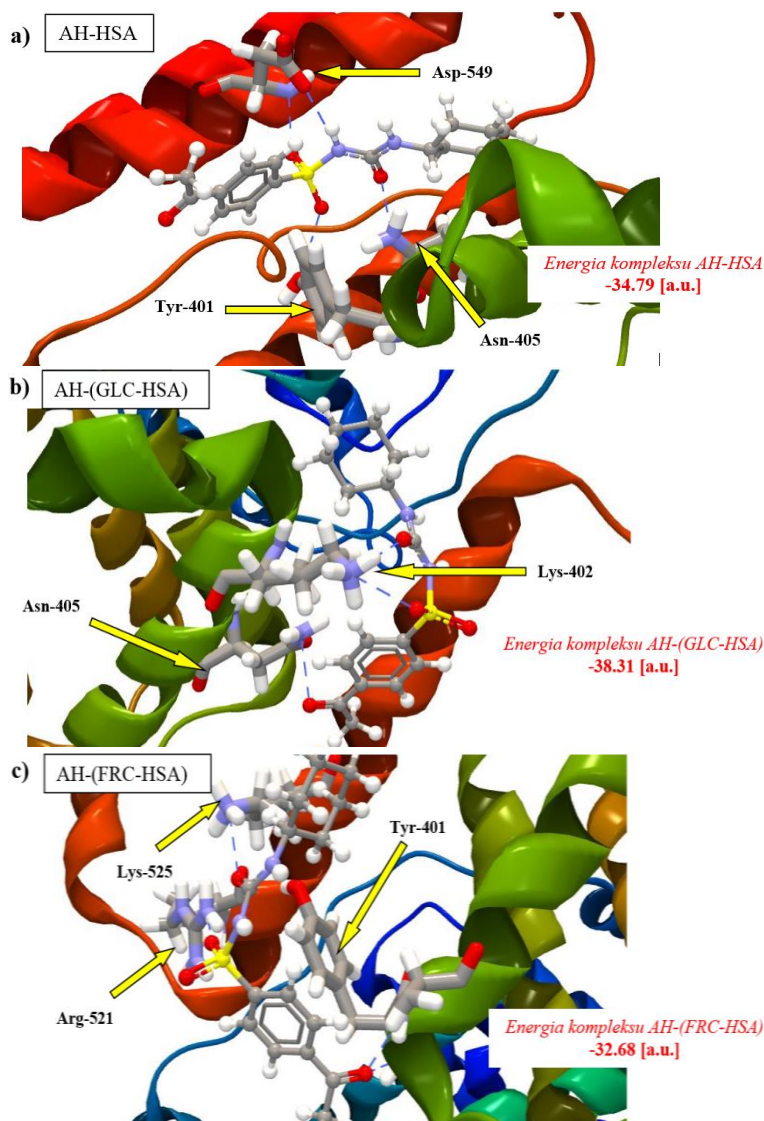
Tab.3 Stała asocjacji K_a oraz liczba cząsteczek AH związanych z jedną cząsteczką albuminy (n), wyznaczone z zależności Scatcharda (układ AH-gHSA_{GLC}, AH-gHSA_{FRC}, AH-gHSA_{GAL}) i izoterm wiązania (układ AH-HSA), λ_{ex} 275 nm i λ_{ex} 295 nm.

	AH-HSA		AH-gHSA _{GLC}		AH-gHSA _{FRC}		AH-gHSA _{GAL}	
	λ_{ex} 275nm	λ_{ex} 295nm	λ_{ex} 275nm	λ_{ex} 295nm	λ_{ex} 275nm	λ_{ex} 295nm	λ_{ex} 275nm	λ_{ex} 295nm
$K_a \times 10^4$ ± SE*) [dm ³ mol ⁻¹]	41.26 ± 10.64	18.81 ± 5.33	8.67 ± 0.24	6.23 ± 0.25	12.84 ± 0.35	7.78 ± 0.19	15.24 ± 0.30	9.76 ± 0.25
n_1 ± SE*)	0.55 ± 0.09	0.61 ± 0.14	0.92 ± 0.01	0.94 ± 0.02	0.93 ± 0.01	0.93 ± 0.01	0.91 ± 0.01	0.93 ± 0.01

*) niepewność pomiarowa

Model Scatcharda wiązania liganda do cząsteczki białka zakłada skończoną liczbę miejsc wiążących dla liganda, wówczas zależność Scatcharda ($r/[L_f] = f(r)$) ma przebieg prostoliniowy i przecina oś odciętych układu współrzędnych (oś r). Liniowy przebieg zależności $r/[L_f] = f(r)$ dla układu AH-gHSA_{GLC}, AH-gHSA_{FRC} i AH-gHSA_{GAL} wskazuje istnienie jednej klasy równocennych, niezależnych miejsc wiązania acetoheksamidu w strukturze albuminy (lub jednego miejsca wiązania) charakteryzujących się jednakową stałą asocjacji K_a . Z kolei dla układu AH-HSA zaobserwowano kształtem zbliżoną do hiperboli nieliniową zależność Scatcharda. Zjawisko to może wynikać z istnienia więcej niż jednej klasy miejsc wiążących ligand w HSA (wiązanie heterogeniczne), niespecyficznego charakteru wiązania AH z makromolekułą lub negatywnej kooperatywności. Po założeniu istnienia dwóch klas równocennych, niezależnych miejsc wiązania, parametry wiązania dla kompleksu AH-HSA wyznaczono metodą nieliniowej regresji w oparciu o algorytm Levenberga-Marquardta. W pierwszej klasie miejsc wiązania, stałe asocjacji K_a wyznaczone dla kompleksu acetoheksamidu z białkiem glikowanym są mniejsze niż dla kompleksu acetoheksamidu z albuminą niemodyfikowaną (HSA > gHSA_{GAL} > gHSA_{FRC} > gHSA_{GLC}) (Tab.3). Zarejestrowana średnia liczba cząsteczek AH związana z jedną cząsteczką albuminy glikowanej (n) jest większa od wartości n uzyskanej dla HSA niemodyfikowanej, co oznacza, że glikacja HSA zmniejsza trwałość (stabilność) wiązania leku przez albuminę, ale jednocześnie zwiększa liczbę cząsteczek AH wiążącą się do jednej cząsteczki białka. Do podobnych wniosków doszli Tsuchiya, Koyama i wsp., gdzie wykorzystując odpowiednio filtrację żelową i technikę wygaszania fluorescencji wykazali zmniejszenie powinowactwa acetoheksamidu do albuminy glikowanej (Tsuchiya, Sakurai et al. 1984; Koyama et al. 1997).

Acetoheksamid tworzy wiązania wodorowe w obrębie subdomeny IB, IIA, IIIA (Rys.3) makrocząsteczki z następującymi resztami aminokwasów: Asn-405, Arg-117, Arg-218, Arg-521, Tyr-138, Tyr-161, Tyr-401, Lys-195, Lys-199, Lys-525, Lys-402, Asp-351, Asp-549 oraz Cys-448, jak wskazuje teoretyczny model wiązania acetoheksamid do albuminy natywnej (HSA), skompleksowanej z glukozą (GLC-HSA) i fruktozą (FRC-HSA). Ponieważ energia wiązania kompleksu AH-albumina jest największa stwierdza się, że subdomena IIB makrocząsteczek nie wykazuje właściwości wiążących AH, co może także oznaczać, że kompleks jest najmniej stabilny (Tab.4).



Rys.3 Acetoheksamid (AH) w miejscu wiązania subdomeny IIIA albuminy surowicy krwi a) HSA, b) GLC-HSA, c) FRC-HSA, z zaznaczonymi wiązaniami wodorowymi (----) i resztami aminokwasów biorących udział w oddziaływaniu.

Struktura acetoheksamidu oraz rząd wielkości stałej asocjacji K_a , która charakteryzuje siłę wiązania leku do cząsteczki albuminy może świadczyć, że pomiędzy pierścieniami aromatycznymi AH, a aromatycznymi grupami aminokwasowymi niemodyfikowanej i glikowanej HSA dochodzi do interakcji typu π - π . Babu stwierdził, że oddziaływania tego typu polegają na tworzeniu tzw. struktur kanapkowych (struktura typu „sandwich”) między pierścieniami tryptofanu lub/i tyrozyn a lekiem

(Babu 2003). Oprócz wiązań wodorowych stabilizujących strukturę III-rzędową HSA, to oddziaływania π - π wspomagają utrzymywanie konformacji nowopowstałego kompleksu lek-albumina.

Tab.4 Energia wiązania kompleksu AH-HSA, AH-(GLC-HSA), AH-(FRC-HSA) otrzymana w CLC Drug Discovery Workbench ver. 1.0.2.

NAZWA SUBDOMENY makromolekuly	Wartość energetyczna kompleksu ligand-białko [a.u.]		
	AH-HSA	AH-(GLC-HSA)	AH-(FRC-HSA)
IB	-51.34	-46.74	-5.43
IIB	104.35	-6.37	48.85
IIA	-19.36	-57.26	-53.82
IIIA	-34.79	-38.31	-32.68

4. Wnioski

- a) Acetoheksamid (AH) w badanym zakresie stężeń tworzy kompleks zarówno z albuminą niemodyfikowaną (HSA), jak i glikowaną (gHSA_{GLC}, gHSA_{FRC}, gHSA_{GAL}) w specyficznych dla niego miejscach wiążących oraz niespecyficznie oddziałuje z hydrofobowymi fragmentami powierzchni makrocząsteczek.
- b) Glikacja zmniejsza powinowactwo AH do jego miejsc wiązania w strukturze albuminy, bądź tak zmienia strukturę HSA, że wiązanie AH do zmienionej konformacji albuminy staje się trudniejsze.
- c) Jak wskazuje teoretyczny model wiązania acetoheksamidu do albuminy natywnej (HSA), skompleksowanej z glukozą (GLC-HSA) i fruktozą (FRC-HSA), acetoheksamid tworzy wiązania wodorowe w obrębie subdomeny IB, IIA, IIIA makrocząsteczki. Aminokwasy subdomeny IIB nie biorą udziału w tworzenie kompleksu AH-HSA, AH-(GLC-HSA) i AH-(FRC-HSA).

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy sugerują potrzebę opracowania indywidualnego planu dawkowania leków (zwłaszcza o niskim wskaźniku terapeutycznym) u osób, u których istnieje podejrzenie występowania albuminy o zaburzonej strukturze i zdolności wiążącej, obarczonych schorzeniami przewlekłymi np. cukrzycą. Ponieważ lek w formie związanej do albuminy nie wykazuje aktywności farmakologicznej, a jedynie frakcja wolna może wywołać oczekiwany efekt terapeutyczny bądź toksyczny, znajomość aktywności wiążącej białek pozwoli uzyskać satysfakcjonujące rezultaty wybranej terapii.

Praca zrealizowana ze środków finansowych umowy realizowanej przez Młodego Naukowca nr: KNW-2-O18/N/8/N i KNW-2-O14/N/9/K oraz umowy statutowej KNW-1-033/N/9/O.

5. Literatura

- Ahmed N, Thornalley PJ (2007) Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes Obes Metab* 9: 233–245.
- Artali R, Bombieri G, Calabi L et al. (2005) A molecular dynamics study of human serum albumin binding sites. *II Farmaco* 60(6): 485–495.
- Babu MM (2003) NCI: a server to identify non-canonical interactions in protein structures. *Nucleic Acids Res* 31(13): 3345–3348.
- Broderson R, Sjodin T, Sjöholm I (1977) Independent binding of ligands to human serum albumin. *J Biol Chem* 252: 5067–5072.
- Carter DC, He XM (1990) Structure of serum albumin. *Science* 249: 302–303.
- Eftink MR, Ghiron CA (1981) Fluorescence quenching studies with proteins. *Anal Biochem* 114: 199–227.

- Grigoryan KR, Ghazaryan AG (2013) Quenching mechanism of human serum albumin fluorescence by Gangleron. *Chem Biol* 2: 6–10.
- Hiratsuka T (1990) Conformational changes in the 23-kilodalton NH₂-terminal peptide segment of myosin ATPase associated with ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 265(31): 18786–18790.
- Joseph KS, Anguizola J, Jackson AJ et al. (2010) Chromatographic analysis of acetoexamide binding to glycated human serum albumin. *J Chromatogr B* 878(28): 2775–2781.
- Koyama H, Sugioka N, Uno A et al. (1997) Effects of glycosylation of hypoglycaemic drug binding to serum albumin. *Biopharm Drug Dispos* 18: 791–801.
- Lakowicz JR (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Springer.
- Nawale RB, Mourya VK, Bhise SB (2006) Non-enzymatic glycation of proteins: a cause for complication in diabetes. *Indian Biochem Biophys* 43: 337–344.
- Rondeau P, Bourdon E (2011) The glycation of albumin: structural and functional impacts. *Biochimie* 93: 645–658.
- Szkudlarek A, Pożycka J, Maciążek-Jurczyk M (2019) Influence of piracetam on gliclazide-glycated human serum albumin interaction. A spectrofluorometric study. *Molecules* 24(1): 111.
- Taira Z, Terada H (1985) Specific and non-specific ligand binding to serum albumin. *Biochem Pharm* 34(11): 1999–2005.
- Tsuchiya S, Sakurai T, Sekiguchi SI (1984) Nonenzymatic glucosylation of human serum albumin and its influence on binding capacity of sulfonylureas. *Biochem Pharmacol* 33: 2967–2971.
- Zhang Q, Ames JM, Smith RD et al. (2009) A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *J Proteome Res* 8(2): 754–769.
- Zuwała-Jagiełło J (2009) Terapia chorób z udziałem końcowych produktów zaawansowanej glikacji w ich patogenezie. *Pol Merk Lek XXVII*: 152–158.