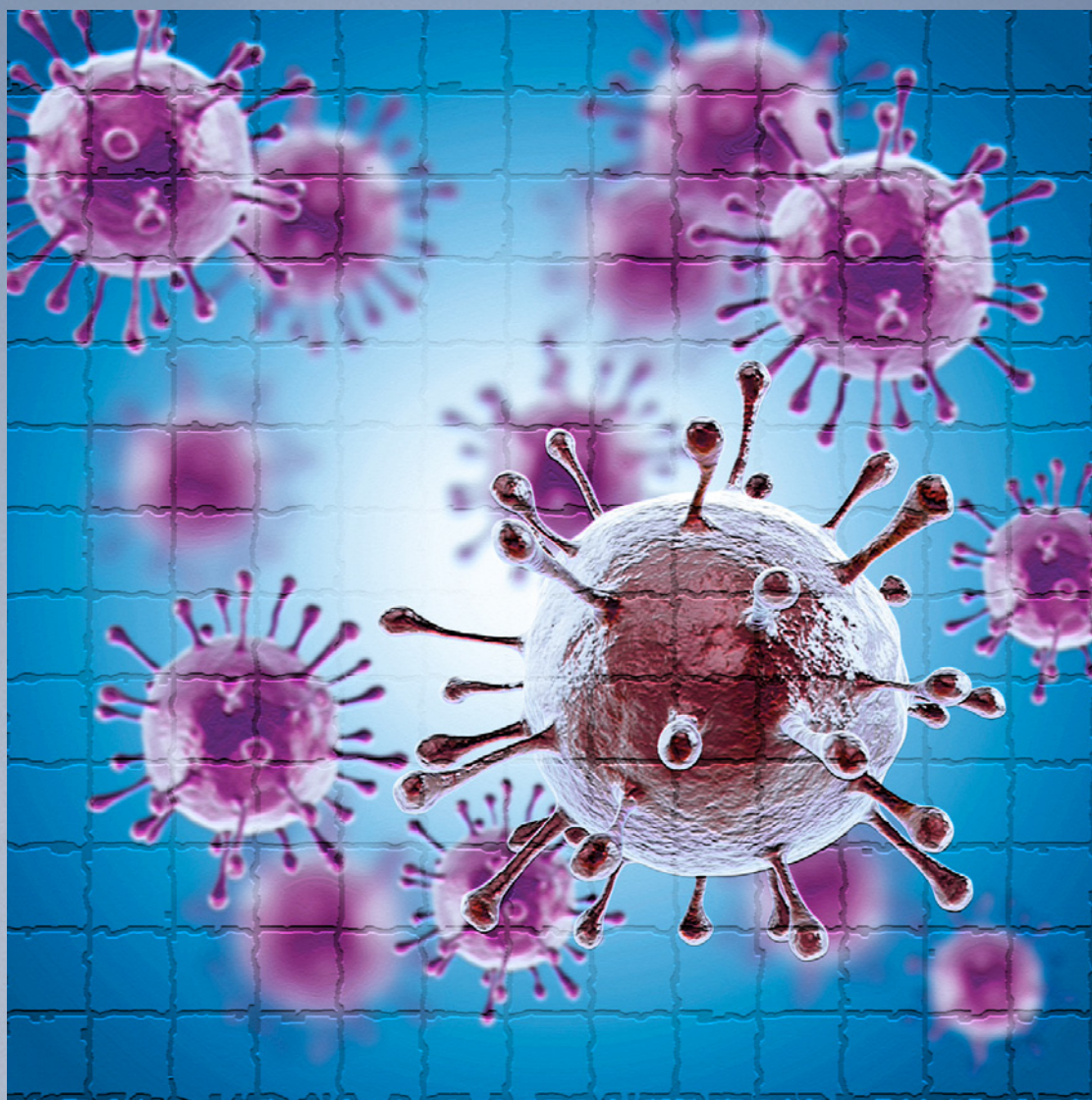


POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI

Zeszyty Naukowej Fundacji Polpharmy



NAUKOWA
FUNDACJA
POLPHARMY

POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI

ADVANCES IN POLISH MEDICINE
AND PHARMACOLOGICAL SCIENCES

Tom 6, 2019



NAUKOWA
FUNDACJA
POLPHARMY

WARSZAWA 2019

WERSJA ON-LINE CZASOPISMA NAUKOWEGO NAUKOWEJ FUNDACJI POLPHARMY



NAUKOWA
FUNDACJA
POLPHARMY

Szanowni Państwo, drodzy czytelnicy

z przyjemnością informujemy, że wszystkie publikacje czasopisma naukowego „**POTĘPY POLSKIEJ MEDYCYNY I FARMACJI. ZESZYTY NAUKOWEJ FUNDACJI POLPHARMY**” (ISSN: 2082-8470) są dostępne on-line na specjalnie przygotowanym portalu czasopisma, zgodnie z międzynarodowymi standardami.

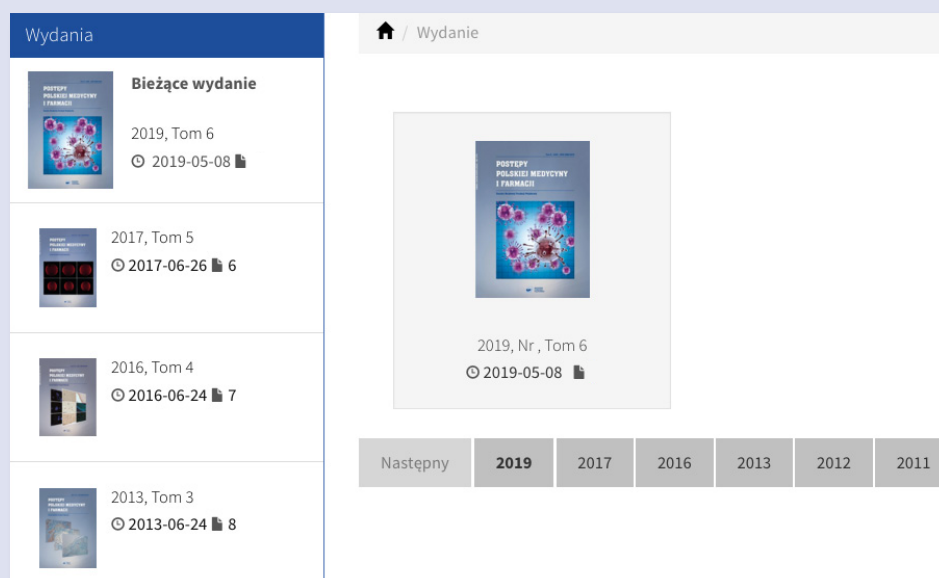
Wersja on-line jest dostępna pod adresem:

WWW.POSTEPYPOLSKIEJMEDYCYNYIFARMACJI.ONLINE



NA STRONIE DOSTĘPNE SĄ:

- ✓ WSZYSTKIE PUBLIKACJE, PEŁNE ARCHIWUM OD PIERWSZEGO WYDANIA Z PEŁNYMI TEKSTAMI W FORMACIE PDF DO POBRANIA;
- ✓ WSZYSTKIE INFORMACJE O RADZIE NAUKOWEJ ORAZ REDAKCJI CZASOPISMA;
- ✓ NIEZBĘDNE INFORMACJE DLA AUTORÓW, ZAINTERESOWANYCH PUBLIKACJĄ W KOLEJNYCH WYDANIACH.



AKTUALNIE
NA STRONIE
OPUBLIKOWANE JEST
BIEŻĄCE WYDANIE:
TOM 6/2019

ZACHĘCAMY PAŃSTWA DO KORZYSTANIA Z ELEKTRONICZNYCH WERSJI CZASOPISMA FUNDACJI!

Z wyrazami szacunku
Redakcja czasopisma naukowego
Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji.
Zeszyty Naukowej Fundacji Polpharmy

POSTĘPY POLSKIEJ MEDYCyny I FARMACJI
ADVANCES IN POLISH MEDICINE AND PHARMACOLOGICAL SCIENCES

Editor-in-Chief, Chairman of the Editorial Board • Redaktor Naczelny, Przewodniczący Rady Naukowej PPMiF
prof. dr hab. n. med. Zbigniew Gaciong, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Associate Editor • Kolegium redakcyjne
Bożenna Płatos, Naukowa Fundacja Polpharmy, Warszawa

Chairman of the Scientific Council • Przewodniczący Rady Naukowej Naukowej Fundacji Polpharmy
prof. dr hab. Kazimierz Roszkowski-Śliż, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

Editorial Board • Rada Naukowa

prof. dr hab. Edward Franek
prof. dr hab. Zbigniew Gaciong
prof. dr hab. Piotr Kuna
prof. dr hab. Grzegorz Opolski
prof. dr hab. Adam Płażnik
prof. dr hab. Jarosław Reguła
prof. dr hab. Kazimierz Roszkowski-Śliż
prof. dr hab. Janina Stępińska
prof. dr hab. Jerzy Szaflik
prof. dr hab. Mirosław Wielgoś

Honourable Editorial Board • Honorowa Rada Naukowa

prof. dr hab. Waldemar Banasiak
prof. dr hab. Stefan Chłopicki
prof. dr hab. Grzegorz Gryniewicz
prof. dr hab. Marek Jarema
prof. dr hab. Roman Kaliszan
prof. dr hab. Roman Lorenc
prof. dr hab. Edmund Przeglasiński
prof. dr hab. Jacek Rożniecki
prof. dr hab. Jacek Spławski
prof. dr hab. Cezary Szczylik
prof. dr hab. Marian Zembala

Editorial office • Redakcja
Assistant Editor • Redaktor Prowadzący
Paweł Stypulkowski
pawel.stypulkowski@indexcopernicus.com

Associate Editor • Kolegium Redakcyjne
Bożenna Płatos
bozenna.platos@polpharma.com

Publisher • Wydawca

INDEX COPERNICUS
I N T E R N A T I O N A L

Index Copernicus sp. z o.o.
ul. Kasprzaka 31A/184 • 01-234 Warszawa
e-mail: office@indexcopernicus.com
www.indexcopernicus.com

Published for • Wydawane dla

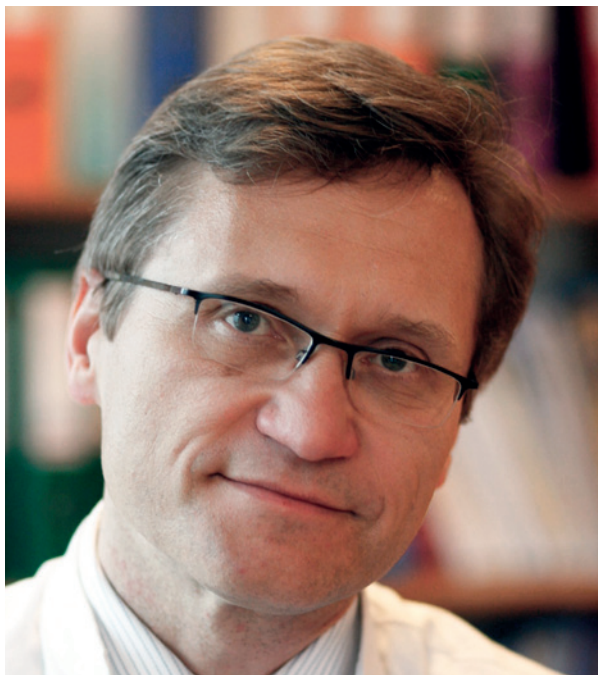


President • Prezes Zarządu
dr Wojciech Kuźmierkiewicz
Vice-president • Wiceprezes Zarządu
Agata Łapińska
Board Member • Członek Zarządu
dr Beata Kamosińska

Naukowa Fundacja Polpharmy
ul. Bobrowiecka 6 • 00-728 Warszawa
tel.: 22 364 63 13 • e-mail: fundacja@polpharma.com
www.polpharma.pl/fundacja

Spis treści • Table of contents

- ?? **Słowo wstępne**
Editorial
Zbigniew Gaciong
- ?? **Analogi morficeptyny jako potencjalne leki o działaniu przeciwbólowym i przeciwbiegunkowym**
Morphiceptin analogs as potential analgesic and anti-diarrheal agents properties
Katarzyna Gach-Janczak, Anna Janecka
- ?? **Znaczenie stresu oksydacyjnego w immunoterapii nowotworów z wykorzystaniem komórek NK**
The role of oxidative stress in NK-cell based cancer immunotherapy
Marta Kłopotowska, Magdalena Winiarska
- ?? **Naturalne terpeny jako substancje o wielokierunkowej aktywności biologicznej**
Natural terpenes as substances with multidirectional biological activities
Karolina A. Wojtunik-Kulesza, Monika Waksmundzka-Hajnos
- ?? **Stężenie irisiny a zaburzenia czynności tarczycy – nowości w endokrynologii**
Irisin and thyroid dysfunction – news in endocrinology
Ariadna Zybek-Kocik, Marek Ruchała
- ?? **Nowe czynniki białkowo-lipidowe w patomechanizmie preeklampsji łagodnej**
Novel protein-lipid factors in the pathomechanism of mild preeclampsia
Karol Charkiewicz
- ?? **Cyklodekstryny jako wielofunkcyjne substancje pomocnicze**
Cyclodextrins as multifunctional excipients
Magdalena Paczkowska, Judyta Cielecka-Piontek
- ?? **Potencjał terapeutyczny ceragenin oraz nanosystemów zawierających substancje aktywne błonowo w terapii chorób nowotworowych**
Therapeutic potential of ceragenins and nanosystems containing membrane active compounds in the anti-cancer therapies
Ewelina Piktel, Robert Bucki
- ?? **Znaczenie współzależności FGFR2 - RSK2 w progresji raka piersi. Badania in vitro oraz analizy materiału klinicznego**
Significance of FGFR2 - RSK2 interdependence for breast cancer progression. In vitro studies and clinical material analyses
Dominika Czaplińska



Słowo wstępne

Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Gaciong

Przewodniczący Rady Naukowej

Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji,

Redaktor Naczelny

Szanowni Państwo!

Trafia do Państwa kolejny numer *Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji*, który zawiera publikacje powstałe w wyniku realizacji projektów naukowych finansowanych przez Naukową Fundację Polpharmy.

W 2006 r. Fundacja utworzyła program stypendialny adresowany do najzdolniejszych doktorantów, którzy wyłaniani są w drodze konkursu organizowanego raz na dwa lata. Laureatką VI edycji w roku 2015/16 jest dr n. med. Ewelina Piktel, która uczestniczy w badaniach nad cerageninami – pochodnymi soli żółciowych, które dotychczas uważano cząsteczki o potencjalnym działaniu przeciwbakteryjnym i antywirusowym. Badania zespołu, którego członkiem jest Laureatka wskazują, że nanocząsteczki będące nośnikami ceragenin mogą także znaleźć zastosowanie w terapii nowotworów. Autorzy pracy zamieszczonej w postępiech podsumowują wiedzę nad potencjalnym zastosowaniem tych związków w terapii nowotworów cytując także własne prace na liniach komórek raka jelita grubego i piersi.

W obecnym wydaniu Zeszytów znalazło się kilka prac, których autorami są laureaci V Edycji programu dla doktorantów. Wśród nagrodzonych jest Marta Kłopotowska, która bierze udział w pracach zespołu zajmującego się immunoterapią nowotworów. Ostatnie lata to ogromny postęp w onkologii związany z terapią celowaną na określone mutacje i wykorzystaniem własnego układu odpornościowego pacjenta do walki z komórkami nowotworowymi. W klinice są już stosowane własne komórki cytotoksyczne chorego uzbrojone w receptory nakierowane na antygeny nowotworu. Zespół dr hab. n. med. Magdaleny Winiarskiej pracuje nad sposobami zwiększenia skuteczności terapii poprzez poznanie czynników związanych z mikrośrodowiskiem guza, które powodują odporność na atak immunologiczny. Badania dr Kłopotow-

skiej dowodzą, że istotnym celem dla przyszłych terapii może być redukcja stresu oksydacyjnego w tkance guza.

Praca doktorska Karoliny Wojtunik-Kuleszy wiąże się z poszukiwaniem związków o potencjalnym zastosowaniu leczniczym wśród terpenów (izoprenoidów) pochodzenia roślinnego. W świecie roślin terpeny, będące między innymi składnikami żywicy, pełnią rolę substancji przyciągającej lub odstraszającej owady. Substancje zawarte w olejkach eterycznych badane przez doktorantkę posiadają zdolność hamowania wybranych enzymów, takich jak acetylocholinoesteraza (AChE) czy α -glukozydaza co daje podstawy do dalszych badań prowadzących do ich zastosowania w tak częstych schorzeniach jak choroba Alzheimera czy cukrzyca.

W grupie wyróżnionych w V edycji doktorantów znalazła się także Ariadna Zybek-Kocik, która zajmuje się badaniami nad irisiną, nowo odkrytym peptydem, wydzielanym przez pracujące mięśnie. Uzyskane w trakcie realizacji projektu wyniki dowodzą, że niedoczynność tarczycy wiąże się z obniżeniem stężenia irisiny co może tłumaczyć występowanie miopatii w tej chorobie. Dr Zybek-Kocik jest pierwszym autorem oryginalnej publikacji zawierającej wyniki powstałe w trakcie przewodu doktorskiego, która ukazała się w prestiżowym piśmie *Clinical Endocrinology*.

Z kolei tematyka przewodu doktorskiego Magdaleny Paczkowskiej dotyczy cyklodekstryn, wielocukrów o budowie cyklicznej, zwykle uzyskiwanych na drodze hydrolizy skrobi. Związki te są powszechnie używane w przemyśle spożywczym ale mogą także być nośnikami wielu leków zwiększając ich trwałość oraz biodostępność. W wyniku badań Doktorantki opracowano metody umieszczania w cząsteczce be-

ta-cyklodekstryny kilku powszechnie stosowanych leków, w tym preparatów antybakteryjnych, co daje nadzieje na zwiększenie ich skuteczności.

Kolejny laureat – Karol Charkiewicz, w swoim przewodzie doktorskim zajmuje się czynnikami związanymi z patomechanizmem preeklampsji – groźnego powikłania, które występuje w 3-5% ciąży. Publikacja zamieszczona w Zeszytach zawiera wyniki badań, które ukazały się w renomowanych pismach *Cytokine* i *PLoS One*. Autorzy wymienionych publikacji wskazują, że w rozwoju preeklampsji mogą mieć znaczenie niektóre białka angiogenne i czynniki lipidowe.

Również Dominika Czaplińska należy do grona doktorantów – laureatów V edycji konkursu Fundacji. Zespół, w którego pracach bierze udział Autorka zajmuje się rolą kinaz z rodziny RSK w powstaniu i progresji raka piersi. Przedstawione wyniki, zarówno badań doświadczalnych, jak i obserwacji klinicznych, wskazują, że aktywacja szlaku tych kinaz wiąże się zarówno z rozwojem nowotworu, jak niekorzystnym rokowaniem. Daje to podstawę do poszukiwania nowych metod terapii nakierowanych na ten mechanizm.

Zapraszam do lektury
Prof. dr hab. n. med. Zbigniew Gaciong



Analogi morficeptyny jako potencjalne leki o działaniu przeciwbólowym i przeciwbiegunkowym

Morphiceptin analogs as potential analgesic and anti-diarrheal agents

Katarzyna Gach-Janczak,
Anna Janecka

Zakład Biochemii Biomolekularnej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Naukowa Fundacja Polpharmy przyznała w 2014 roku zespołowi pracującemu pod kierunkiem dr n. med. Katarzyny Gach-Janczak grant na realizację projektu badawczego pt. „Badanie właściwości farmakologicznych analogów peptydów opioidowych jako nowych potencjalnych leków o działaniu przeciwbólowym i przeciwbiegunkowym”.

Streszczenie

Morficeptyna (Tyr-Pro-Phe-Pro-NH₂) – peptyd opioidowy, powstający w wyniku enzymatycznej degradacji białka mleka β -kazeiny, jest selektywnym ligandem receptorów μ -opiodowych. Receptory te odgrywają bardzo ważną rolę w znoszeniu bólu, a także w regulacji czynności wielu układów, między innymi przewodu pokarmowego. Ze względu na szybką degradację przez enzymy proteolityczne, jak i niską biodostępność, morficeptyna nie może być stosowana jako lek.

Celem projektu była synteza i ocena profilu farmakologicznego nowych analogów morficeptyny, w poszukiwaniu związków o silnym działaniu przeciwbólowym i przeciwbiegunkowym, które działałyby wyłącznie obwodowo i byłyby aktywne po podaniu doustnym.

W ramach projektu otrzymaliśmy pięć serii analogów morficeptyny. Szczególnie interesujące okazały się związki modyfikowane przy użyciu β -aminokwasów.

Zastosowane β^2 - lub β^3 -aminokwasów w pozycji 2 lub 3 oraz zastąpienie Tyr przez Dmt (2',6'-dimetylotyrozynę) w pozycji 1 pozwoliło uzyskać analogi odporne na degradację enzymatyczną, o mieszanym profilu powinowactwa do receptorów opioidowych.

Analog o sekwencji Dmt-D-Ala-(R)- β^2 -1-Nal-Pro-NH₂ [Nal=3-(1-naftylo)-alanina] wybrany został do badań *in vivo* na myszach. Peptyd ten wykazywał silne działanie przeciwbólowe (znoszenie bólu trzewnego) oraz przeciwbiegunkowe (porównywalne do loperamidu), po podaniu do otrzewnowym, jak również doustnym. Test PAMPA wykazał, że związek ten praktycznie nie przenika przez sztuczną błonę imitującą barierę krew-mózg i w związku z tym jego działanie powinno być wyłącznie obwodowe. Otrzymany analog wydaje się interesującym związkiem wiodącym w opracowywaniu leków o budowie peptydowej działających wyłącznie obwodowo, które mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu zaburzeń żołądkowo-jelitowych, takich jak zespół jelita nadwrażliwego.

Słowa kluczowe: morficeptyna, peptydy opioidowe, synteza peptydów, β -aminokwasy, degradacja enzymatyczna, powinowactwo do receptorów

Abstract

Morphiceptin (Tyr-Pro-Phe-Pro-NH₂) – an opioid peptide, originating from enzymatic degradation of milk protein, β -casein, is a selective li-

Wpłynęło: 10-01-2019
Zaakceptowano: 10-05-2019
Opublikowano: 20-05-2019

Adres do korespondencji
dr hab. n. med. Katarzyna
Gach-Janczak
Zakład Biochemii Biomolekularnej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź
e-mail: katarzyna.gach@umed.lodz.pl

gand μ -opioid receptors. These receptors play an important role in reduction of pain sensitivity and in the regulation of the functions of many systems, including the gastrointestinal tract. Due to the rapid degradation by proteolytic enzymes and low bioavailability, morphiceptin can not be used as a medicine.

The aim of the project was the synthesis and evaluation of the pharmacological profile of novel morphiceptin analogs, in search of compounds with a strong analgesic and anti-diarrheal activity, which acted only peripherally and are active after oral administration.

We synthesized five series of morphiceptin analogs. The most interesting turned out compounds modified with the use of β -amino acids.

Modification of morphiceptin at positions 2 or 3 by introduction of β^2 - or β^3 -amino acids and additionally in position 1 by replacing Tyr by Dmt (2',6'-dimethyltyrosine), resulted in obtaining enzymatically stable analogs with mixed opioid receptor affinity profiles.

An analog of the sequence Dmt-D-Ala-(R)- β^2 -1-Nal-Pro-NH₂ [Nal=3-(1-naphthyl)-alanine] was selected for *in vivo* experiments in mice. This peptide showed a strong antinociceptive effect (peripheral analgesic) and antidiarrheal activity (comparable to loperamide) after intraperitoneal as well as oral administration. The PAMPA test, showed that this compound did not cross the artificial membrane imitating the blood-brain barrier and therefore its action should be only peripheral. The new analog may become an interesting lead compound in the development of peripherally restricted drugs for the treatment of gastrointestinal disorders.

Keywords: morphiceptin, opioid peptides, peptide synthesis, β -amino acids, enzymatic degradation, receptor affinity

WPROWADZENIE

Morfina, główny alkaloid opium, charakteryzujący się silnym działaniem przeciwbólowym i narkotycznym, wywołuje takie efekty poprzez aktywację receptorów opioidowych w mózgu ssaków. Receptory opioidowe zostały odkryte w latach 70. ubiegłego wieku przez trzy niezależne zespoły badawcze: Snydera, Simona i Tereniusa i podzielone pod kątem ich działania na trzy główne typy: μ (mi), δ (delta) i κ (kappa) [1-3]. Receptory te, szeroko rozpowszechnione w organizmie, zlokalizowane są przede wszystkim w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). W obwodowym układzie nerwowym znajdują się na zakończeniach aferentnych włókien nerwowych. Występują również w tkankach peryferyjnych, głównie w jelitach, komórkach nabłonkowych naczyń krwionośnych i w komórkach układu odpornościowego. Receptory opioidowe odgrywają bardzo ważną rolę w przekazywaniu informacji bólowej [4], a także w regulacji czynności wielu układów, między innymi przewodu pokarmowego [5]. Rola poszczególnych typów recepto-

rów opioidowych nie jest jeszcze w pełni poznana i jest przedmiotem badań. Uważa się, że stymulacja wszystkich trzech typów receptorów opioidowych wywołuje działanie przeciwbólowe, mimo to największy udział w tym procesie odgrywa receptor μ -opioidowy. Jednakże receptor ten odpowiada również za szereg niepożądanych efektów ubocznych, takich jak: sedacja, depresja oddechowa, zahamowanie perystaltyki jelit, a także rozwój tolerancji i uzależnienia fizycznego [6].

Pierwszym poznany ligandem receptorów opioidowych była morfina, roślinny związek o budowie alkaloidowej, działający głównie poprzez receptor μ . Mimo niekorzystnych efektów ubocznych morfina do dziś jest jednym z najbardziej skutecznych leków, stosowanych w zwalczaniu silnego bólu. Intensywne badania prowadzone nad systemem opioidowym doprowadziły do wyizolowania endogennych ligandów receptorów opioidowych. Odkrycie w latach 80. ubiegłego wieku morfineptyny (Tyr-Pro-Phe-Pro-NH₂) [7, 8], pierwszego selektywnego ligandu receptora μ -opioidowego o budowie

peptydowej, a kilkanaście lat później endomorfina (endogennych ligandów receptora μ) [9] dało nadzieję na wykorzystanie ich jako środków przeciwbólowych, równie silnych jak morfina, ale bezpieczniejszych i pozbawionych jej efektów ubocznych. Jednak przez wiele lat peptydy opioidowe nie były uważane za dobre środki farmakologiczne. Głównym ograniczeniem związanym z ich egzogennym zastosowaniem była ich niska stabilność enzymatyczna (szybka degradacja przez enzymy proteolityczne) [10] oraz słaba biodostępność po podaniu doustnym.

Rozwój technik syntezy peptydów sprawił, że znacznie wzrosło zainteresowanie peptydami opioidowymi jako potencjalnymi kandydatami na leki [11, 12]. Związki te charakteryzują się stosunkowo dużą aktywnością, selektywnością i niską toksycznością, a dzięki modyfikacjom chemicznym możliwe jest znaczne zwiększenie ich stabilności enzymatycznej i biodostępności. Różnorodne modyfikacje struktury cząsteczek pozwalają również uzyskać analogi o lepszym profilu farmakologicznym niż macierzyste peptydy, a zatem o zwiększonej aktywności biologicznej i/lub wybiórczości miejsca działania (działanie ośrodkowe lub obwodowe).

Celem wielu badaczy zajmujących się tematyką opioidową jest znalezienie związków działających ośrodkowo, a więc przechodzących przez barierę krew-mózg, które wywoływałyby równie silny efekt przeciwbólowy jak morfina, ale nie powodowałyby uzależnienia/tolerancji. W tym przypadku szczególnie duży nacisk kładziony jest na otrzymanie peptydów lipofilowych, które będą przenikały do mózgu i aktywowały receptory μ -opiodowe zlokalizowane ośrodkowo. Z drugiej jednak strony, również związki, które nie przechodzą przez barierę krew-mózg wydają się ciekawe, przede wszystkim w przypadku, gdy chcemy uzyskać efekt miejscowy, np. w obrębie przewodu pokarmowego.

Peptydy opioidowe zaczynają być postrzegane jako klasa związków, która może stać się źródłem leków lepszych niż aktualnie stosowane w leczeniu lub też leków zupełnie nowych – adresowanych przeciwko schorzeniom, na które w chwili obecnej nie istnieje skuteczna terapia.

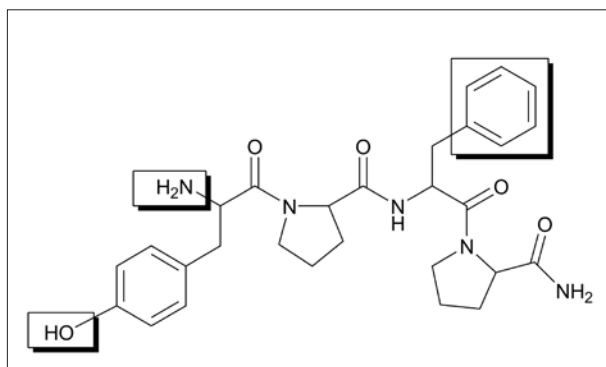
Ostatnio zwraca się uwagę na możliwość zastosowania analogów morficeptyny w leczeniu schorzeń przewodu pokarmowego, charakteryzujących się dolegliwościami bólowymi i nadmierną hipermotoryką jelit, takich jak biegunka czy zespół jelita nadwrażliwego.

MORFICEPTYNA I JEJ ANALOGI

Morficeptyna ($\text{Tyr-Pro-Phe-Pro-NH}_2$) jest tetrapeptydowym amidem, powstającym w wyniku trawienia białka mleka, β -kazeiny [8]. W sekwencji β -kazeiny zawartych jest szereg peptydów opioidowych, nazwanych β -kazomorfinaami (β -CM) [13], które mogą być uwolnione i zaktywowane poprzez hydrolizę enzymatyczną w przewodzie pokarmowym. Morficeptyna początkowo otrzymana została syntetycznie, jako analog zawierający N-końcowy fragment bydlęcej β -CM-7 [7], a dopiero cztery lata później została wyizolowana jako produkt enzymatycznej degradacji β -kazeiny [8]. Morficeptyna jest selektywnym ligandem receptora μ -opiodowego, który wykazuje podobną do morfiny aktywność biologiczną [7, 14, 15].

Morficeptyna działa silnie przeciwbólowo po podaniu dokomorowym (*i.c.v.*), to znaczy bezpośrednio do miejsca działania, jakim jest OUN [14]. Podana peryferyjnie działa na receptory opioidowe zlokalizowane poza OUN i wykazuje silne działanie przeciwbólowe w tkankach obwodowych. W badaniach *in vitro* na izolowanych fragmentach mysich jelit, stymulowanych elektrycznie lub farmakologicznie, morficeptyna powoduje spadek kurczliwości mięśniówki gładkiej jelit [16]. Shook i współ. wykazali, że podskórne (*s.c.*) podanie analogu morficeptyny $\text{Tyr-Pro-NMePhe-Pro-NH}_2$ hamuje biegunkę i spowalnia pasaż jelitowy u myszy [17]. Morficeptyna, podobnie jak i inne peptydy opioidowe, nie jest w stanie przeniknąć do mózgu (nie przechodzi przez barierę krew-mózg), a co za tym idzie nie ma typowego dla opioidów wpływu na OUN. Brak efektów centralnych, takich jak sedacja i uzależnienie sprawiają, że morficeptyna mogłaby znaleźć zastosowanie jako miejscowo działający środek przeciwbiegunkowy i przeciwbólowy, stosowany np. w terapii chorób przewodu pokarmowego, m.in. zespołu jelita nadwrażliwego. Szybka degradacja enzymatyczna oraz niska biodostępność (brak działania po podaniu doustnym) ograniczają jednak możliwość zastosowania morficeptyny jako leku.

Morficeptyna była jednym z pierwszych peptydów opioidowych, których struktura została szczegółowo zbadana, aby wyjaśnić jej powinowactwo i aktywność w stosunku do receptora μ -opiodowego. W strukturze morficeptyny ważną rolę odgrywają grupy farmakoforowe $-\text{OH}$ i $-\text{NH}_2$ Tyr w pozycji 1 i pierścień aromatyczny Phe w pozycji 3, które są niezbędne do połączenia się ligandu z miejscem wiążącym receptora i odpowiadają za wysokie powinowactwo do receptora μ -opiodowego (Ryc. 1).



Rycina 1. Struktura morficeptyny z zaznaczonymi grupami farmakoforowymi.

Z kolei Pro w pozycji 2 stanowi łącznik (ang. *spacer*), który utrzymuje grupy farmakoforowe w odpowiedniej względem siebie odległości i orientacji, co jest niezbędne dla aktywności biologicznej analogów morficeptyny [18].

Badania zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną nowych syntetycznych analogów morficeptyny zapoczątkowane zostały w latach 80. przez Chang'a i współ. [14, 19]. Poszukiwania aktywnych analogów morficeptyny od lat prowadzone są w wielu laboratoriach na świecie jak również w naszym Zespole. Struktura morficeptyny modyfikowana była poprzez zastosowanie D-aminokwasów, nienaturalnych L i D-aminokwasów [16, 20, 21, 22, 23], cyklizację cząsteczek liniowych [24, 25, 26]. Celem wprowadzanych modyfikacji jest otrzymanie analogów o lepszym profilu farmakokinetycznym i farmakologicznym, a więc zwiększonej biodostępności, odporności na działanie enzymów proteolitycznych oraz lepszej aktywności biologicznej (np. silniejszym działaniu przeciwbólowym).

W ramach mojej pracy doktorskiej zsyntetyzowałam i zbadałam pod względem farmakologicznym serię liniowych analogów morficeptyny modyfikowanych w pozycjach 1-3. Badania te doprowadziły do otrzymania analogów: Dmt-D-Ala-D-1-Nal-Pro-NH₂ i Dmt D NMe-Ala-D-1-Nal-Pro-NH₂; [Dmt = 2',6'-dimetylotyrozyna; D-1-Nal = 3-(1-naftylo)D-alanina], które charakteryzowały się odpornością na degradację enzymatyczną oraz wysokim powinowactwem do receptorów μ -opiodowych [16]. W testach *in vivo* po podaniu dootrzewnowym (*i.p.*) peptydy te wykazywały silne peryferyjne działanie przeciwbólowe oraz hamowały pasaż jelitowy. Badane analogi po podaniu (*i.v.*) nie przechodziły przez barierę krew-mózg, a więc nie powinny powodować depresji oddechowej i uzależnienia, efektów typowych dla centralnie działających opiodów. Niestety peptydy te nie były aktywne po podaniu doustnym.

CEL PROJEKTU

Celem projektu finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy było poszukiwanie nowych analogów morficeptyny o silnym działaniu przeciwbólowym (znoszenie bólu trzewnego) i przeciwbiegunkowym, aktywnych po podaniu doustnym. Wyjściową strukturą był wspomniany wyżej peptyd Dmt-D-Ala-D-1-Nal-Pro-NH₂.

W ramach projektu zsyntetyzowaliśmy pięć serii analogów morficeptyny, modyfikowanych przez wprowadzanie nienaturalnych aminokwasów o konfiguracji D i L, β -aminokwasów, zastosowanie wiązań pseudopeptydowych (zredukowane wiązanie peptydowe) oraz cyklizację liniowych sekwencji.

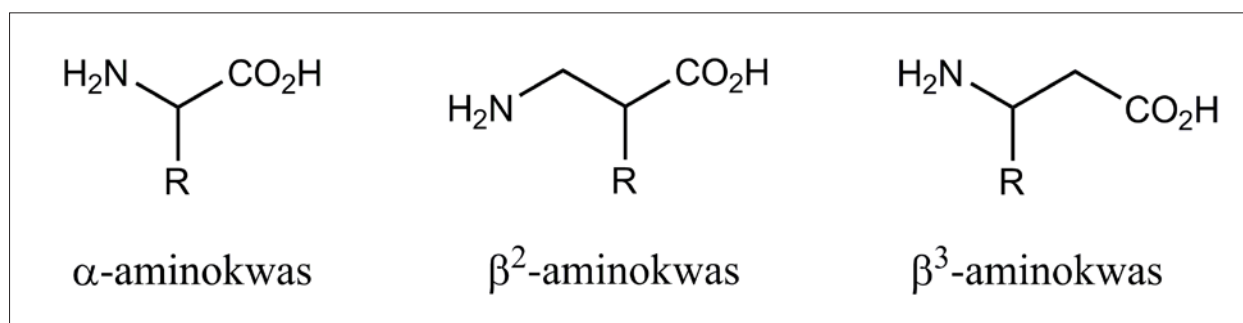
Związki te poddane zostały przesiewowym badaniom farmakodynamicznym *in vitro*. Testy obejmowały ocenę odporności nowych analogów na degradację enzymatyczną, badanie powinowactwa do receptorów opiodowych oraz określenie ich aktywności w teście funkcjonalnym. Na podstawie testów przesiewowych wybraliśmy dwa związki do badań *in vivo*, w których oceniliśmy ich aktywność przeciwbólową oraz przeciwbiegunkową.

Szczególnie interesujące okazały się analogi modyfikowane przy użyciu β -aminokwasów oraz analogi cykliczne zawierające nienaturalne D-aminokwasy. W niniejszym artykule przedstawione zostały wyniki uzyskane dla związków modyfikowanych przy zastosowaniu β -aminokwasów.

MODYFIKACJE PRZY UŻYCIU β -AMINOKWASÓW

W α -aminokwasach grupy funkcyjne aminowa i karboksylowa oddzielone są od siebie przez jeden atom węgla, natomiast w β -aminokwasach grupy te rozdzielają dwa atomy węgla. β -Aminokwasy zawierające przy węglu α (C2) lub przy węglu β (C3) łańcuch boczny (inny niż atom H), mogą występować jako izomery R lub S, dając odpowiednio β^2 - lub β^3 -aminokwasy (Ryc. 2).

W piśmiennictwie odnaleźć można liczne przykłady pokazujące, że zastąpienie α -aminokwasów przez ich β -analogi pozwala uzyskać peptydomietyki o silniejszym działaniu biologicznym oraz o zwiększonej stabilności enzymatycznej [27, 28]. Niewiele jest jednak prac dotyczących zastosowania β -aminokwasów w peptydach opiodowych [29-32]. Wykazano, że endomorfiny zawierające takie aminokwasy są znacznie mniej podatne na



Rycina 2. Struktura α - i β -aminokwasów.

degradację przez enzymy proteolityczne [32] oraz w większości przypadków silniej wiążą się do receptorów opioidowych [33].

WYNIKI

W ramach niniejszego projektu otrzymaliśmy serię analogów morficeptyny modyfikowanych w pozycjach 2 i 3 przez zastosowanie nienaturalnych β^2 - lub β^3 -aminokwasów (β -Ala i β -1-Nal) [34]:

- 1 Tyr-Pro-Phe-Pro-NH₂, Morficeptyna
- 2 Dmt-(R)- β^2 -Ala-D-1-Nal-Pro-NH₂
- 3 Dmt-(R)- β^3 -Ala-D-1-Nal-Pro-NH₂
- 4 Dmt-D-Ala-(R)- β^2 -1-Nal-Pro-NH₂
- 5 Dmt-D-Ala-(S)- β^2 -1-Nal-Pro-NH₂
- 6 Dmt-D-Ala-(R)- β^3 -1-Nal-Pro-NH₂

Dmt=2',6'- dimetylotyrozyna, 1-Nal=3-(1-naftylo)-alanina

Aminokwasy (R)- β^2 - i (R)- β^3 -Ala oraz (R)- β^3 -1-Nal są dostępne komercyjnie, natomiast (R)- i (S)- β^2 -1-Nal nie są dostępne na rynku. Aminokwasy te zostały zsyntetyzowane i scharakteryzowane w ramach projektu. W pierwszym etapie otrzymano mieszaninę racemiczną obu enancjomerów R i S. Następnie w wyniku reakcji z optycznie czynną aminą uzyskano dwa diastereoizomery, które rozdzielono chromatograficznie. Po otrzymaniu struktury krystalicznej jednego z diastereoizomerów, możliwe było przypisanie konfiguracji absolutnej (R) – i (S) - β^2 -1-Nal obu enancjomerom.

Wprowadzenie do cząsteczki morficeptyny β^2 - lub β^3 -aminokwasów w pozycji 2 lub 3 oraz zastą-

pienie Tyr przez Dmt w pozycji 1 pozwoliło uzyskać analogi odporne na degradację enzymatyczną [34]. Okres półtrwania w przypadku trawienia przy użyciu dipeptydylopeptydazy (DPP IV) dla morficeptyny wynosił tylko 16 minut. Natomiast wszystkie nowe analogi wykazywały bardzo dobrą stabilność enzymatyczną, z $t_{1/2}$ od 2 do 5 godzin (Tabela 1). Peptydy te charakteryzowały się również bardzo silnym powinowactwem do receptorów μ -opiodowych (nano- i subnanomolowe wartości K_i). Podczas gdy wartość K_i dla morficeptyny wyniosła 90 nM, analogi 2 i 3 z (R)- β^2 - lub (R)- β^3 -Ala miały wartości K_i w zakresie nanomolowym, a peptydy 4-6 z (R)- β^2 -, (S)- β^2 - lub (R)- β^3 -1-Nal w zakresie subnanomolowym. W przeciwieństwie do morficeptyny, która jest selektywnym ligandem receptora μ -opiodowego, nowe związki wiązały się również do receptorów δ i κ -opiodowych. Test funkcjonalny wykazał, że wszystkie badane peptydy były agonistami receptorów opioidowych, przy czym analog 2 charakteryzował się mieszanym μ/δ , a analog 4 mieszanym $\mu/\delta/\kappa$ profilem opiodowym (Tabela 1).

Analogi 2 i 4, zawierające odpowiednio (R)- β^2 -Ala i (R)- β^2 -1-Nal, wybraliśmy do dalszych badań na zwierzętach.

Przed przystąpieniem do testów *in vivo*, w celu sprawdzenia, czy nowe związki mogą przenikać barierę krew-mózg, a zatem działać na receptory opiodowe zlokalizowane w OUN wykonany został test PAMPA (ang. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*). Test ten polega na symulowaniu w warunkach *in vitro* procesów związanych z transportem substancji błony biologiczne [35, 36] i uważany jest za model transportu pasywnego przez barierę krew-mózg. Test PAMPA wykazał, że oba badane analogi 2 i 4 praktycznie nie przenikały przez sztuczną barierę krew-mózg (Tabela 2). W związku z tym ich działanie powinno być wyłącznie obwodowe. Związki takie wydają się szczególnie ciekawe przede wszystkim, gdy chcemy uzyskać efekt

Tabela 1. Powinowactwo do receptorów opioidowych oraz stabilność enzymatyczna morficeptyny i jej analogów 2-6 [34].

No.	Sekwencja	Kia [nM]			DPPIVb 90 min
		mu	delta	kappa	t1/2 (min)
1	Morficeptyna	93 ± 12	10199 ± 307	-	15.75 ± 1
2	Dmt-(R)-β2-Ala-D-1-Nal-Pro-NH2	4.06 ± 0.08	0.05 ± 0.01	233 ± 28	1150 ± 92***
3	Dmt-(R)-β3-Ala-D-1-Nal-Pro-NH2	7.22 ± 0.06	239 ± 15	133 ± 19	1150 ± 50***
4	Dmt-D-Ala-(R)-β2-1-Nal-Pro-NH2	0.05 ± 0.01	1.04 ± 0.06	11.18 ± 0.56	3450 ± 130***
5	Dmt-D-Ala-(S)-β2-1-Nal-Pro-NH2	0.65 ± 0.01	29.9 ± 2.7	38.0 ± 3.16	3450 ± 15***
6	Dmt-D-Ala-(R)-β3-1-Nal-Pro-NH2	0.34 ± 0.04	238 ± 14	1749 ± 42	2300 ± 105***

^a Wypieranie [³H]DAMGO. ^b Wypieranie [³H][D-Ala²]deltorfiny-2. ^c Wypieranie U-69,593, [PHENYL-3,4-³H] z miejsc wiązania w receptorach opioidowych.

^b Okres półtrwania (t_{1/2}) peptydów po 90 min inkubacji z DPPIV.

Analizę statystyczną przeprowadzono, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (ang. *one-way ANOVA*) z testem wielokrotnego porównania post-hoc Studenta-Newmana-Keuls. *** p<0.001 w porównaniu do morficeptyny.

Tabela 2. Przenikalność przez sztuczną barierę krew-mózg dla związków 2 i 4 w teście PAMPA [34].

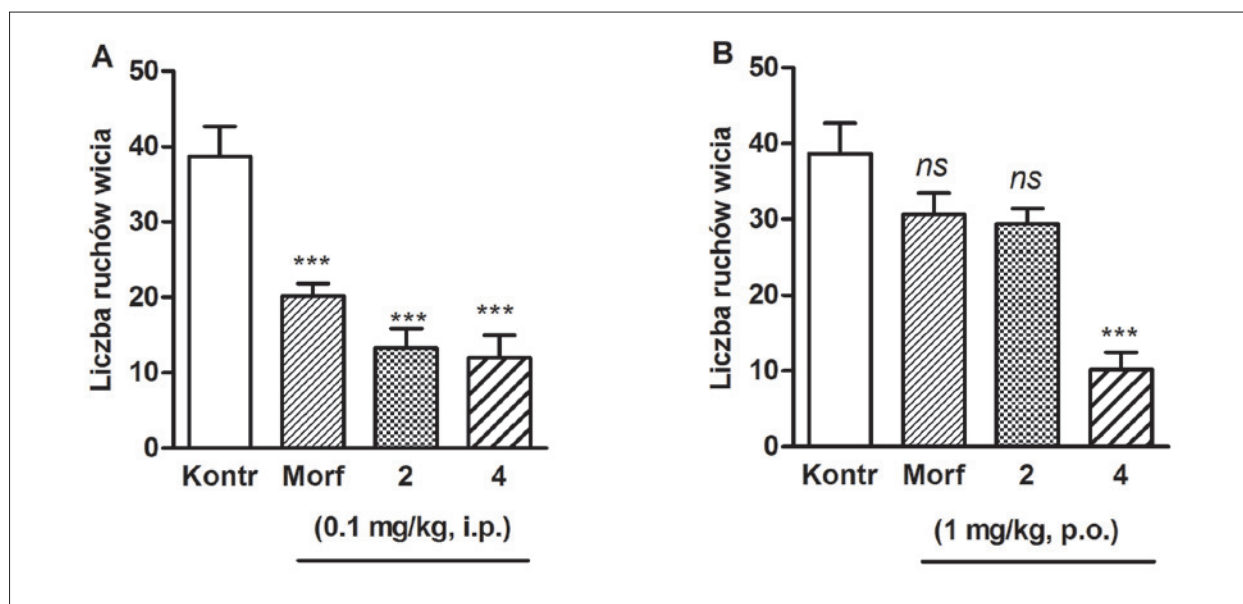
Związek	BBB przepuszczalność	Średnia (%)	Klasyfikacja przepuszczalności
	P _e (10 ⁻⁶ cm ³) ± SD	Mass balance ± SD	
Werapamil	29.9 ± 6.5	89.28 ± 2.35	wysoka
Teofilina	≤ 0.58	98.21 ± 3.65	niska
2	≤ 0.58	96.72 ± 2.01	niska
4	≤ 0.58	97.25 ± 1.83	niska

miejscowy np. w obrębie przewodu pokarmowego. Ich zaletą jest brak ośrodkowych efektów ubocznych (jak depresja oddechowa, uzależnienie).

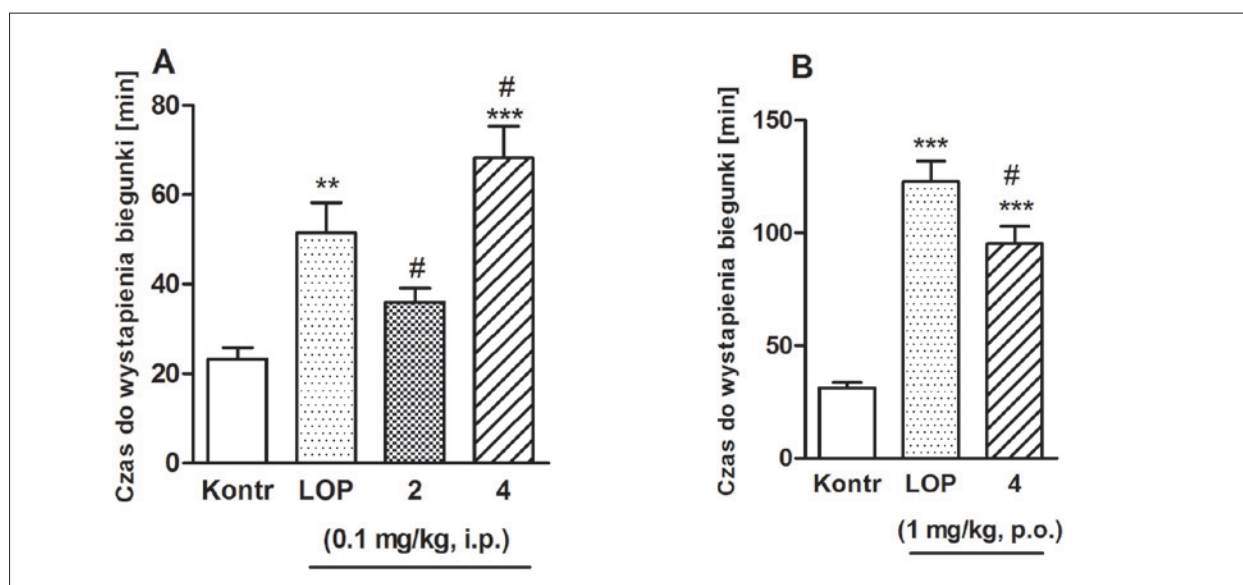
Testy *in vivo* na myszach obejmowały zbadanie działania przeciwbólowego i właściwości przeciwbiegunkowych. Ocenę obwodowej aktywności przeciwbólowej (wpływ na receptory opioidowe zlokalizowane obwodowo, poza OUN) przeprowadziliśmy za pomocą testu wicia (ang. *writhing test*). Oba testowane analogi 2 i 4 podane *i.p.* zmniejszały liczbę charakterystycznych ruchów wicia (indukowanych wstrzyknięciem roztworu kwasu octowego), a zatem znacząco zmniejszały objawy bólowe (Ryc. 3). Działanie peptydu macierzystego – morficeptyny było słabsze. Związek 4 wykazywał działanie przeciwbólowe również po podaniu doustnym (*p.o.*) i ponad 4-krotnie zmniejszał liczbę ruchów wicia.

Działanie przeciwbiegunkowe nowych związków ocenione zostało w mysim modelu biegunki wywołanej olejem rycynowym. Po podaniu *i.p.* analog 4 powodował silny efekt przeciwbiegunkowy (Ryc. 4A), a jego działanie było silniejsze od zastosowanego w tej samej dawce, znanego leku przeciwbiegunkowego o budowie niepeptydowej – loperamidu. Ważnym podkreśleniem jest fakt, że związek ten działał również po podaniu doustnym (Ryc. 4B). Jednak w tym przypadku jego działanie było słabsze od loperamidu. Analog 2 nie wykazywał efektu przeciwbiegunkowego.

Uważa się, że spośród trzech typów receptorów opioidowych, aktywacja receptora μ-opioidowego powoduje najsilniejszy efekt przeciwbólowy. Do niedawna chemicy i farmakolodzy skupiali się przede



Ryc. 3. Wpływ morfeptyny (Morf) oraz analogów 2 i 4 w dawce A) 0.1 mg/kg *i.p.* oraz B) 1 mg/kg *p.o.* na liczbę ruchów wicia u myszy [34]. Analizę statystyczną wykonano, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (ang. *one-way ANOVA*) z testem wielokrotnego porównania post-hoc Studenta-Newmana-Keuls. ****p* < 0.001, w porównaniu do kontroli.



Ryc. 4. Wpływ loperamidu (LOP) oraz analogów 2 i 4 w dawce A) 0.1 mg/kg *i.p.* oraz B) 1 mg/kg *p.o.* na czas wystąpienia biegunki u myszy [34]. Analizę statystyczną wykonano, stosując jednoczynnikową analizę wariancji (ang. *one-way ANOVA*) z testem wielokrotnego porównania post-hoc Studenta-Newmana-Keuls. ****p* < 0.001, ***p* < 0.01 w porównaniu do kontroli. #*p* < 0.05 w porównaniu do LOP.

wszystkim na otrzymywaniu analogów o wysokiej selektywności głównie do tego jednego typu receptora opioidowego. Ostatnio jednak coraz większe zainteresowanie budzą związki o mieszanym profilu powinowactwa [37, 38]. Najnowsze badania wykazują, że wielofunkcyjne ligandy opioidowe oddziałujące jednocześnie z więcej niż jednym typem receptora opioidowego, mogą wywoływać silniejszy efekt przeciwbólowy [39], a przy tym powodować mniej efektów ubocznych niż selektywni agoniści receptora μ -opioidowego [40].

Porównanie powinowactwa do receptorów opioidowych omówionego wyżej analogu 4 (Dmt-D-Ala-(R)- β^2 -1-Nal-Pro-NH₂), opartego na strukturze wcześniej otrzymanego przez nas peptydu Dmt-D-Ala-D-1-Nal-NH₂ [16], wskazuje że zastąpienie α -aminokwasów przez ich β - odpowiedniki powoduje przekształcenie μ -selektywnych ligandów w peptydomimetyki o mieszanym profilu opioidowym. Silne działanie przeciwbólowe 4, w porównaniu z μ -selektywną morfeptyną może wynikać z faktu, że związek ten aktywuje nie tylko receptory

μ -opiodowe, ale jest także δ i w mniejszym stopniu κ agonistą. Zastosowanie β -aminokwasów wydaje się godną uwagi strategią w projektowaniu nowych peptydowych leków opiodowych o lepszym profilu farmakologicznym.

PODSUMOWANIE

Farmakologia peptydów i receptorów opiodowych jest szybko rozwijającą się dziedziną badań, w którą zaangażowane są grupy badawcze w wielu krajach. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat [12] na świecie zostały zsyntetyzowane setki analogów endomorfiny i morfiny i choć żaden z nich nie trafił jeszcze do leczenia, to wzbogaciły one w znaczący sposób naszą wiedzę o endogennym układzie opiodowym. Synteza i badanie nowych analogów opiodowych o coraz lepszych właściwościach farmakologicznych wciąż trwa i można przypuszczać, że suma zebranych doświadczeń doprowadzi w końcu do wprowadzenia na rynek farmaceutyczny leków o budowie peptydowej o silnych właściwościach przeciwbólowych i/lub przeciwbiegunkowych, które będą mogły zastąpić konwencjonalne środki stosowane w chwili obecnej.

Nasze badania wykazały, że zastosowanie β -aminokwasów pozwala uzyskać peptydomimetyki o silnym działaniu biologicznym, wysokiej stabilności metabolicznej, które działają po podaniu doustnym [34]. Otrzymany przez nas analog Dmt-D-Ala-(R)- β^2 -1-Nal-Pro-NH₂ wykazujący silne działanie przeciwbólowe i przeciwbiegunkowe, wydaje się być interesującym związkiem wiodącym w opracowywaniu leków o budowie peptydowej działających wyłącznie obwodowo. Takie związki mogłyby znaleźć zastosowanie w leczeniu zaburzeń żołądkowo-jelitowych, takich jak np. zespół jelita nadwrażliwego.

PODZIĘKOWANIA

Badania zostały sfinansowane ze środków Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (502-03/1-156-02/502-14-191, 503/1-156-02/503-11-02) oraz Naukowej Fundacji Polpharmy (grant na projekt badawczy 11/XIII/2014). Badania krystalograficzne β -aminokwasów zostały sfinansowane ze środków przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Instytutowi Chemii Ogólnej i Ekologicznej Politechniki Łódzkiej.

PIŚMIENNICTWO

1. Pert C.B., Snyder S.H., Opiate receptor: demonstration in nervous tissue, *Science*, 1973; 179: 1011-4.
2. Simon E.J., Hiller J.M., Edelman L., Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973; 70: 1947-9.
3. Terenius L., Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex, *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 1973; 32: 317-20.
4. Janecka A., Fichna J., Janecki T., Opioid receptors and their ligands. *Curr Top Med Chem*, 2004; 4: 1-17.
5. Sobczak M. et al., Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: current concepts and future perspectives, *J Gastroenterol*, 2014; 49: 24-45.
6. Benyamin R. et al., Opioid complications and side effects, *Pain Physician*, 2008; 11: 105-120.
7. Chang K.J. et al., Morphiceptin (NH₄-tyr-pro-phe-pro-COHN₂): a potent and specific agonist for morphine (μ) receptors, *Science*, 1981; 212: 75-7.
8. Chang K.J. et al., Isolation of a specific μ -opiate receptor peptide, morphiceptin, from an enzymatic digest of milk proteins, *J Biol Chem*, 1985; 260: 9706-12.
9. Zadina J.E. et al. A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor, *Nature*, 1997; 386: 499-502.
10. Janecka A. et al., Enzymatic degradation of endomorphins, *Peptides*, 2008; 29: 2066-73.
11. Janecka A. et al., Development of opioid peptide analogs for pain relief. *Curr Pharm Des.*, 2010, 16: 1126-35.
12. Liu W.X., Wang R., Endomorphins: potential roles and therapeutic indications in the development of opioid peptide analgesic drugs, *Med Res Rev.*, 2012; 32: 536-80.
13. Brantl V. et al., Novel opioid peptides derived from casein (beta-casomorphins). I. Isolation from bovine casein peptide, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 1979; 360: 1211-16.
14. Chang K.J. et al., Analgesic activity of intracerebroventricular administration of morphiceptin and betacasomorphins: correlation with the morphine (μ) receptor binding affinity, *Life Sci*, 1982; 30: 1547-51.
15. Janecka A. et al., Structure-activity relationship, conformation and pharmacology studies of morphiceptin analogs-selective μ -opioid receptor ligands, *Mini Rev Med Chem.*, 2002; 2: 565-72.
16. Gach K. et al., Synthesis and biological evaluation of novel peripherally active morphiceptin analogs, *Peptides*. 2010; 31: 1617-24.

17. Shook J.E. et al., Antidiarrheal properties of supraspinal mu and delta and peripheral mu, delta and kappa opioid receptors: inhibition of diarrhea without constipation, *J Pharmacol Exp Ther*, 1989; 249: 83-90.
18. Yamazaki T. et al., A topochemical approach to explain morphiceptin bioactivity, *J. Med. Chem.*, 1993; 36: 708-719.
19. Chang K.J. et al., Potent morphiceptin analogs: structure activity relationships and morphine-like activities, *J Pharmacol. Exp. Ther.*, 1983; 227: 403-408.
20. Fichna J. et al., Opioid receptor binding and in vivo antinociceptive activity of position 3-substituted morphiceptin analogs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 320: 531-36.
21. Fichna J. et al., [Dmt¹, D-1-Nal³]morphiceptin, a novel opioid peptide analog with high analgesic activity, *Peptides*, 2008; 29: 633-38.
22. Adamska A. et al., Synthesis, biological evaluation and structural analysis of novel peripherally active morphiceptin analogs. *Bioorg Med Chem.*, 2016; 24: 1582-8.
23. Adamska-Bartłomiejczyk A. et al., Synthesis, receptor binding studies, optical spectroscopic and in silico structural characterization of morphiceptin analogs with cis-4-amino-L-proline residues, *J Pept Sci.*, 2017; 23: 864-70.
24. Vogel D. et al., Cyclic morphiceptin analogs: cyclization studies and opioid activities in vitro, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1996; 48: 495-502.
25. Janecka A. et al., Synthesis and antinociceptive activity of cyclic endomorphin-2 and morphiceptin analogs, *Biochem. Pharmacol.*, 2005; 71: 188-195.
26. Fichna J. et al., Effect of 2',6'-dimethyl-L-tyrosine (Dmt) on pharmacological activity of cyclic endomorphin-2 and morphiceptin analogs, *Bioorg Med Chem*, 2011; 19: 6977-81.
27. Steer D.L. et al., Beta-amino acids: versatile peptidomimetics, *Curr. Med. Chem.*, 2002; 9: 811-22.
28. Mollica A. et al., Hybrid alpha/beta-peptides: for-Met-Leu-Phe-OMe analogues containing geminally disubstituted beta2, 2- and beta 3, 3-amino acids at the central position, *Amino Acids*, 2006; 30: 453-59.
29. Cardillo G., et al., Synthesis and binding activity of endomorphin-1 analogues containing beta-amino acids, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000; 10: 2755-258.
30. Cardillo G. et al., Endomorphin-1 analogues containing beta-proline are mu-opioid receptor agonists and display enhanced enzymatic hydrolysis resistance, *J. Med. Chem.*, 2002; 45:2571-78.
31. Keresztes A. et al., New endomorphin analogues containing alicyclic beta-amino acids: influence on bioactive conformation and pharmacological profile, *J. Med. Chem.*, 2008; 51: 4270-79.
32. Wang Y. et al., A new class of highly potent and selective endomorphin-1 analogues containing α -methylene- β -aminopropanoic acids (map), *J. Med. Chem.*, 2012; 55: 6224-36.
33. Cardillo G. et al., Stability against enzymatic hydrolysis of endomorphin-1 analogues containing betaproline, *Org. Biomol. Chem.*, 2003; 1: 1498-1502.
34. Gach-Janczak K. et al., Synthesis and activity of opioid peptidomimetics with β 2- and β 3-amino acids, *Peptides*, 2017; 95: 116-123. *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy.*
35. Ottaviani G., Martel S., Carrupt P.A., Parallel Artificial Membrane Permeability Assay: A new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability, *J. Med. Chem.*, 2006; 49: 3948-54.
36. Di L. et al., Comparison of blood-brain barrier permeability assays: in situ brain perfusion MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB, *J. Pharm. Sci.*, 2009; 98: 1980-91.
37. Morphy R., Rankovic Z., Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm, *J. Med. Chem.*, 2005; 48: 6523-43.
38. Morphy R., Rankovic Z., Designing multiple ligands – medicinal chemistry strategies and challenges, *Curr. Pharm. Des.*, 2009; 15: 587-600.
39. Schiller P.W., Bi- or multifunctional opioid peptide drugs, *Life Sci.*, 2010; 86: 598-603.
40. Günther T. et al., Targeting multiple opioid receptors – improved analgesics with reduced side effects? *Br. J Pharmacol.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13809>.

Znaczenie stresu oksydacyjnego w immunoterapii nowotworów z wykorzystaniem komórek NK

The role of oxidative stress in NK-cell based cancer immunotherapy

Marta Kłopotowska,
Magdalena Winiarska

Zakład Immunologii, I Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Finansowanie: Praca była finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki 2015/19/B/NZ6/02862 (MW), 2014/13/N/NZ6/02081 (MK), Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego 1M19/PM12D/15/15 (MK). Niniejszy artykuł powstał w związku z pracą doktorską przygotowaną przez Martę Kłopotowską w Zakładzie Immunologii I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, współfinansowaną w ramach stypendium naukowego przyznanego przez Naukową Fundację Polpharmy.

Streszczenie

W ostatnich latach zastosowanie immunoterapii w leczeniu chorób nowotworowych zyskuje na znaczeniu. Szczególną odmianą immunoterapii jest terapia adoptywna z wykorzystaniem cytotoksycznych limfocytów T lub komórek NK. Komórki NK dzięki naturalnym zdolnościom precyzyjnego rozpoznawania i zabijania komórek nowotworowych, z zachowaniem tolerancji względem zdrowych komórek organizmu, stanowią atrakcyjną strategię o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym. Ponadto komórki NK mogą być poddawane modyfikacji chimerycznymi receptorami antygenowymi (CAR – *chimeric antigen receptors*). Obecnie zarejestrowanych jest kilkadziesiąt badań klinicznych z wykorzystaniem komórek NK w leczeniu nowotworów, w tym kilka badań wykorzystujących pierwotne komórki CAR-NK lub linię komórkową NK-92 modyfikowaną CAR. Pomimo niewątpliwego sukcesu immunoterapii w ostatnich latach, wiele zagadnień pozostaje nadal niewyjaśnionych. Jednym z potężnych ograniczeń efektywnego działania przeciwnowotworowego komórek układu odpornościowego jest immunosupresyjne środowisko guza nowotworowego. Wyniki badań wskazują, że wśród wielu czynników jednym z istotnych elementów towarzyszących nowotworowi jest przewlekły stres oksydacyjny. W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do zahamowania aktywności komórek NK, a mechanizmy odpowiedzialne za ochronę komórek NK przed supresyjnym działaniem stresu oksydacyjnego nie są wystarczająco dobrze zbadane. Z tego względu w swoim przewodzie doktorskim współfinansowanym przez stypendium doktorskie Naukowej Fundacji Polpharmy podjęłam się zbadania i identyfikacji mechanizmów, które mogą chronić komórki NK przed stresem oksydacyjnym. Uzyskane wyniki wskazują na szczególną wrażliwość komórek NK na działanie stresu oksydacyjnego w porównaniu do innych komórek układu odpornościowego. Zaobserwowałam, że zahamowanie układu PRDX1-TXN1-TXNRD1 upośledza funkcje efektorowe komórek NK. Z kolei zwiększenie ilości PRDX1 znacznie poprawia przeżycie komórek NK oraz komórek CAR-NK w obecności H_2O_2 , co może przekładać się na lepszą efektywność komórek NK w warunkach stresu oksydacyjnego.

Słowa kluczowe: komórki NK, immunoterapia, terapie adoptywne, CAR – chimeryczne receptory antygenowe, stres oksydacyjny

Wpłynęło: 10-01-2019
Zaakceptowano: 10-05-2019
Opublikowano: 20-05-2019

Adres do korespondencji
dr n. med. Marta Kłopotowska,
Zakład Immunologii,
I Wydział Lekarski, Warszawski
Uniwersytet Medyczny
ul. Jana Nielubowicza 5,
02-097 Warszawa
e-mail: marta.kłopotowska@wum.edu.pl

Abstract

Immunooncology gained great attention in cancer treatment over the last few years. Adoptive cell therapy is a type of immunotherapy that uses cytotoxic lymphocytes or NK cells. NK cells precisely recognize and kill cancer cells without affecting healthy cells. These properties make NK cells an attractive strategy with potential therapeutic applications. NK cells can be further modified with chimeric antigen receptors (CAR). Currently, several dozen clinical trials with NK cells are registered for cancer treatment, including several CAR-NK cells or NK-92 cell line modified with CAR. Despite the undeniable success of immunotherapy in recent years, many concerns still remain unresolved. One of the challenges for the effective immunotherapy is the immunosuppressive tumor environment. Numerous studies indicate that persistent oxidative stress, an important element associated with cancer, inhibits NK cell activity. However, the exact mechanisms responsible for protecting NK cells against suppressive oxidative stress are not identified. Therefore, in my doctoral dissertation co-financed by the Scientific Polpharma Foundation doctoral scholarship I focused on investigating and identifying mechanisms protecting NK cells against oxidative stress. The obtained results indicate that NK cells are the most sensitive to the oxidative stress, when compared with other immune cells. Moreover, inhibition of PRDX1-TXN1-TXNRD1 system impairs NK cell effector functions, while the increase of PRDX1 significantly improves the survival of NK cells and CAR-NK cells in the presence of H_2O_2 , resulting in improved effectiveness of NK cells under the oxidative stress conditions.

Key words: NK cells, immunotherapy, adoptive therapy, CAR – chimeric antigen receptors, oxidative stress

WSTĘP

Immunoterapia nowotworów

W ostatnich latach następuje intensywny rozwój immunoterapii nowotworów, która polega na wykorzystaniu układu odpornościowego w celu eliminacji komórek nowotworowych. Immunoterapia zyskuje coraz większe znaczenie obok dobrze poznanych form leczenia nowotworów, takich jak: chirurgia, chemioterapia, radioterapia czy terapie celowane. Do różnych form immunoterapii zalicza się przeciwciała monoklonalne, szczepionki czy terapie adoptywne, w których chorem podaje się aktywowane bądź modyfikowane komórki układu odpornościowego o właściwościach cytotoksycznych. Do tej pory największe sukcesy na polu immunoterapii z wykorzystaniem terapii adoptywnych, zwłaszcza nowotworów hematologicznych, odniesiono, stosując limfocyty T modyfikowane chimerycznymi receptorami antygenowymi anty-CD19 (CAR-CD19). Stały się one pierwszą terapią genową zarejestrowaną przez Amerykańską Agencję do spraw Żywności i Leków (FDA – *U S Food and*

Drug Administration) w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej oraz chłoniaków rozlanych z dużych komórek B (DLBCL). Oprócz limfocytów T również komórki NK są potencjalnie rozważane do stosowania w terapiach adoptywnych z wykorzystaniem CAR i są obecnie testowane w badaniach klinicznych (np. NCT03056339, NCT02892695).

Komórki NK

Komórki NK (*natural killers*) należą do komórek układu odpornościowego o właściwościach rozpoznawania i niszczenia komórek zakażonych wirusami oraz niektórych komórek nowotworowych, szczególnie o obniżonej ilości cząsteczek MHC klasy I [1]. Zostały odkryte i opisane w latach 70. XX wieku [2, 3] i były początkowo uznawane za krótko żyjące komórki o właściwościach cytotoksycznych, zaliczane do odpowiedzi nieswoistej. Okazuje się, że niektóre subpopulacje komórek NK przejawiają pewne właściwości odpowiedzi swoistej, należą do długo żyjących, w pełni funkcjonalnych komórek NK o cechach pamięci immunologicznej [4, 5, 6].

U ludzi komórki NK stanowią od 5 do 15% limfocytów krwi i są określane fenotypowo jako komórki CD56⁺CD3⁻. Wśród nich rozróżnia się dwie główne subpopulacje występujące we krwi. Około 90% stanowią komórki CD56^{dim}CD16⁺, o niskiej liczbie cząsteczek CD56 na powierzchni, odpowiedzialne głównie za funkcje cytotoksyczne względem komórek docelowych. Pozostałe 10% to komórki CD56^{bright}CD16⁻ charakteryzujące się dużą ilością antygenu CD56 na powierzchni, pełniące przede wszystkim rolę immunoregulacyjną związaną ze zwiększoną zdolnością wydzielania cytokin [1]. Przyjmuje się, że komórki CD56^{bright} są prekursorami komórek CD56^{dim}. W węzłach chłonnych, w przeciwieństwie do krwi, komórki CD56^{bright} przeważają liczbowo i stanowią od 75% do 95% komórek NK [7, 8, 9].

Cytotoksyczność komórek NK

Od początków odkrycia komórki NK są intensywnie badane ze względu na unikalne zdolności eliminacji komórek nowotworowych lub komórek zakażonych wirusem. Zdolność do zabijania komórek docelowych zwana jest inaczej cytotoksycznością komórek NK. Komórki NK mogą zabijać komórki docelowe (komórki nowotworowe lub zakażone wirusem) bezpośrednio, w procesie znanym też jako naturalna cytotoksyczność, a także pośrednio w procesie cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał ADCC (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*). Naturalna cytotoksyczność komórek NK jest wypadkową sygnałów powstałych z pobudzenia receptorów aktywujących i hamujących znajdujących się na powierzchni komórek NK. W wyniku interakcji komórki NK z komórką docelową dochodzi do wytworzenia połączenia zwanego synapsą lityczną. Przewaga sygnałów aktywujących lub deficyt sygnałów hamujących w obrębie synapsy litycznej prowadzi do aktywacji komórek NK i uwolnienia zawartości ziaren litycznych, zawierających perforinę, granzymy, granulizynę oraz białko TIA-1 [10]. Przy dominacji sygnałów hamujących nie dochodzi do uruchomienia reakcji cytotoksycznej w komórkach NK.

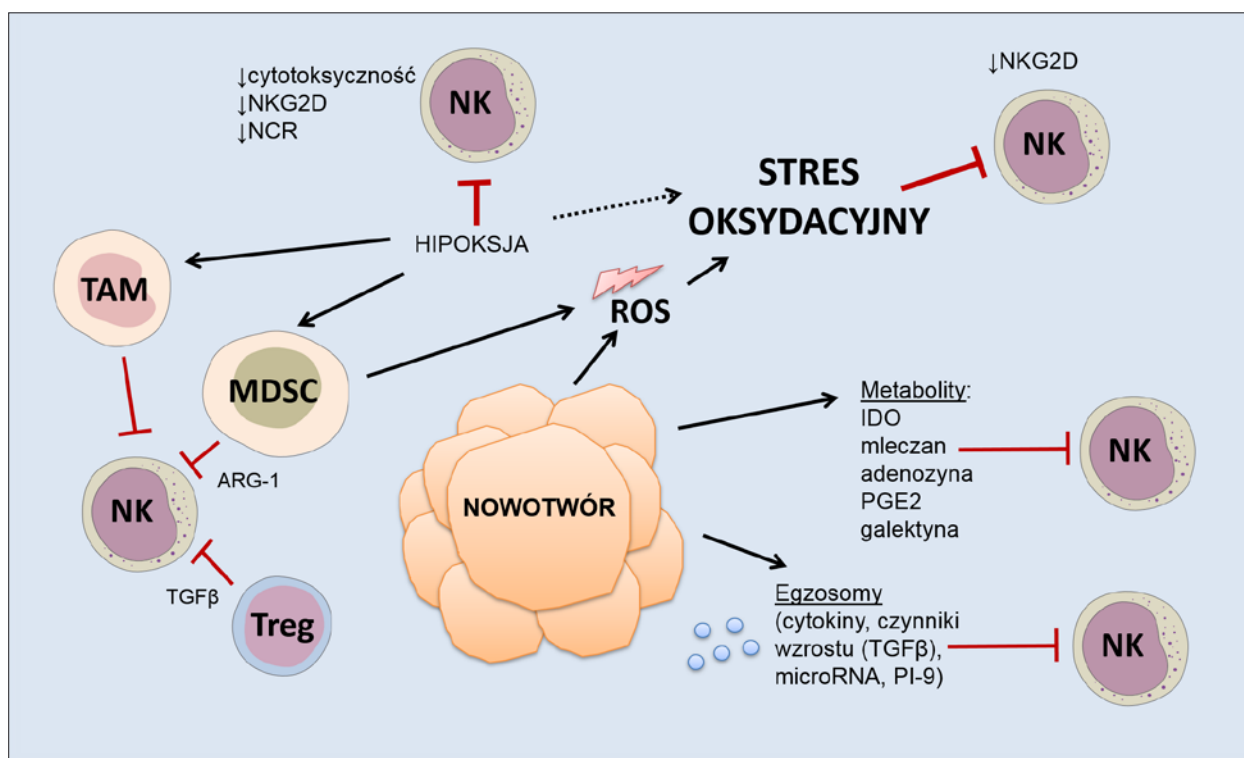
Komórki NK są uznawane za komórki odgrywające kluczową rolę w cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (ADCC). Głównym receptorem umożliwiającym zajście tego procesu jest cząsteczka CD16 (FcγRIIIa) [11], umożliwiająca komórkom NK rozpoznanie fragmentu Fc przeciwciał w klasie IgG związanych z antygenami komórek docelowych. CD16 jest jedynym naturalnie występującym receptorem komórek NK, którego pobudzenie nie wymaga dodatkowych sygnałów kostymulujących powstałych z pobudzenia innych receptorów,

żeby wywołać reakcję cytotoksyczną. Poprzez proces ADCC komórki NK przyczyniają się do efektu terapeutycznego przeciwciał monoklonalnych stosowanych w immunoterapii, takich jak przeciwciała anty-CD20 (np. rytuksymab czy ofatumumab) stosowane w terapii nowotworów wywodzących się z limfocytów B [12]. Warto wspomnieć, że niektóre z przeciwciał monoklonalnych są dodatkowo modyfikowane, aby wzmocnić aktywację komórek NK w mechanizmie ADCC. Przykładem takiego przeciwciała jest obinutuzumab – humanizowane przeciwciało anty-CD20, którego łańcuch ciężki został pozbawiony reszt fukozy. Dzięki tej modyfikacji obinutuzumab wykazuje większe powinowactwo do wiązania z receptorem CD16 niż jego niemodyfikowana forma [13].

Rola komórek NK w odpowiedzi przeciwnowotworowej

Komórki NK mogą uczestniczyć w kontroli progresji nowotworu poprzez bezpośrednią interakcję z komórkami nowotworowymi lub pośrednio poprzez wpływ na inne komórki układu odpornościowego. Liczne badania wskazują, że u chorych z nowotworami [14, 15, 16], a także członków ich rodzin [17, 18], obserwuje się obniżoną aktywność komórek NK. W dużym prospektywnym badaniu kohortowym, prowadzonym przez 11 lat, w którym przeanalizowano ponad 3500 ludzi, wykazano, że umiarkowana (43–58% u mężczyzn, 35–51% u kobiet) oraz podwyższona aktywność komórek NK (>58% u mężczyzn, >51% u kobiet) koreluje ze zmniejszonym ryzykiem zachorowania na raka, podczas gdy niska (42% u mężczyzn, 34% u kobiet) aktywność komórek NK związana jest z częstszym występowaniem nowotworów [19]. Innym przekonującym dowodem na udział komórek NK w odpowiedzi przeciwnowotworowej jest częstsze występowanie chorób nowotworowych związanych z zakażeniami wirusowymi, np. HPV (*human papilloma virus*) czy EBV (*Epstein-Barr virus*) u osób z pierwotnymi niedoborami manifestującymi się całkowitym brakiem komórek NK [20].

O tym, jak skuteczne mogą być komórki NK w eliminacji komórek nowotworowych przekonano się także w pionierskich badaniach prowadzonych w 2002 roku, w których dokonywano przeszczepu szpiku chorym z ostrą białaczką szpikową [21]. U wszystkich chorych, u których przeprowadzono przeszczep pomimo częściowej niezgodności KIR-MHC klasy I uzyskano pięcioletnie przeżycie bez progresji choroby. Natomiast u chorych, którzy otrzymywali przeszczep od całkowicie zgodnych dawców obserwowano zaledwie 25% przypadków pięcioletniego



Rycina 1. Uproszczony schemat przedstawiający hamujący wpływ mikrośrodowiska nowotworu na komórki NK.

przeżycia bez progresji choroby. Badanie to wykazało, że komórki NK dawcy obecne w przeszczepianym szpiku mogą pełnić korzystną rolę w eliminacji komórek nowotworowych u biorcy szpiku. W oparciu o powyższe obserwacje rozwijanych jest kilka strategii terapeutycznych. Jedną z nich jest zablokowanie receptorów hamujących typu KIR przy użyciu przeciwciał monoklonalnych anti-KIR, takich jak testowany w badaniach klinicznych lirilumab (NCT03347123, NCT01714739, NCT03203876, NCT02599649, NCT02481297, NCT03341936, NCT02399917).

Wpływ mikrośrodowiska nowotworu na aktywność komórek NK

Pomimo udokumentowanej roli komórek NK w kontroli progresji nowotworu, w bezpośrednim otoczeniu komórek nowotworowych, zwanych mikrośrodowiskiem, występuje szereg czynników, które mogą ograniczać skuteczne działanie komórek NK. Mikrośrodowisko nowotworu stanowią komórki podścieliska (fibroblasty), naczynia krwionośne i limfatyczne, macierz pozakomórkowa oraz naciekające komórki układu odpornościowego. Liczne doniesienia naukowe ostatnich lat podkreślają istotną rolę wzajemnych interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi a mikrośrodowiskiem w progresji nowotworu [15], [22]. Należą do nich zarówno bezpośrednie interakcje między komórkami, jak i pośrednie oddzia-

ływania poprzez wydzielane cytokiny, chemokiny czy czynniki wzrostu. Występujące w otoczeniu nowotworu komórki układu odpornościowego mogą istotnie wpływać na warunki mikrośrodowiska. Pod wpływem wydzielanych czynników mogą modulować funkcjonowanie innych komórek układu odpornościowego lub same mogą ulegać istotnym zmianom funkcjonalnym i metabolicznym.

Wśród komórek układu odpornościowego naciekających nowotwór występują m.in. komórki NK [23]. Zaobserwowano, że wśród komórek NK naciekających nowotwory, przeważnie występują komórki o fenotypie mniej dojrzałym, CD56^{bright} [22, 23, 24, 25, 26].

Ważną rolę w kształtowaniu mikrośrodowiska nowotworu odgrywają komórki układu odpornościowego o charakterze supresorowym, do których należą przede wszystkim mieloidalne komórki o charakterze supresorowym (MDSC – *myeloid-derived suppressor cells*), limfocyty T regulatorowe (Treg) oraz makrofagi związane z nowotworem (TAM – *tumor-associated macrophages*) [27]. Duża infiltracja komórek o charakterze supresorowym w mikrośrodowisku guza jest znanym czynnikiem związanym z gorszą prognozą w niektórych typach nowotworów [22, 24, 28, 29]. Komórki te wykazują działanie hamujące względem komórek NK, ograniczając ich zdolności cytotoksyczne względem komórek nowotworowych. Komórki su-

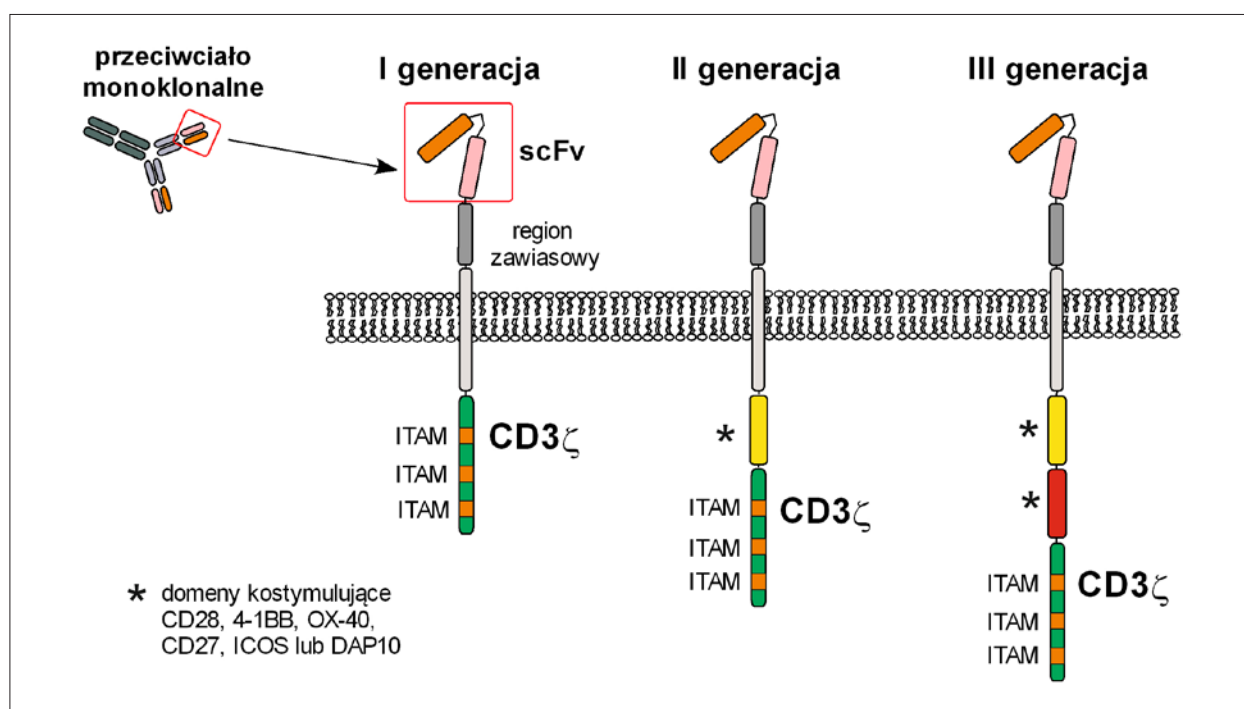
presorowe oraz same komórki nowotworowe mogą wytwarzać znaczne ilości czynników immunosupresyjnych, takich jak TGF- β , IL-10, arginaza-1, tlenek azotu, 2,3 dioksygenaza indoloaminy (IDO), prostaglandyna E2 (PGE2) adenozyne czy reaktywne formy tlenu (ROS), które bezpośrednio oddziałują na komórki NK. Na rycinie 1 przedstawiono schematycznie hamujący wpływ na komórki NK wybranych elementów mikrośrodowiska nowotworu.

Chimericzne receptory antygenowe

W ostatnich latach przełomem w terapiach adoptywnych stało się wprowadzenie technologii chimerycznych receptorów antygenowych (CAR – *chimeric antigen receptor*). CAR jest to typ fuzyjnego receptora, który po wprowadzeniu do komórek układu odpornościowego umożliwia im rozpoznanie i zabicie komórek nowotworowych. CAR zbudowany jest z części zewnątrzkomórkowej, rozpoznającej daną cząsteczkę na powierzchni komórki nowotworowej, części przezbłonowej oraz wewnątrzkomórkowych domen przekazujących sygnały aktywujące do wnętrza komórki [30, 31]. Część zewnątrzkomórkową stanowi najczęściej jednołańcuchowy fragment pochodzący z części zmiennej przeciwciał monoklonalnych (scFv – *single-chain variable fragment*). Zaletą takiej konstrukcji jest możliwość ukierunkowania CAR na konkretny antygen na powierzchni komórki nowotworowej, a samo rozpoznanie antygeny odbywa się bez restrykcji MHC. W zależności od ilości domen aktywujących wyróżnia się trzy gene-

racje cząsteczek CAR. Receptory I generacji zawierają jedną domenę aktywującą CD3 ζ . Do cząsteczek CAR II generacji zalicza się receptory zawierające, oprócz domeny CD3 ζ , jedną z domen: CD28, OX40 (CD134), 4-1BB (CD137), CD27, DAP10 lub ICOS dostarczającą sygnały kostymulujące. W skład części wewnątrzkomórkowej CAR III generacji wchodzi CD3 ζ oraz dwie z wyżej wymienionych domen. Schematyczne przedstawienie cząsteczek CAR poszczególnych generacji zamieszczono na rycinie 2.

Komórkami docelowymi do wprowadzania CAR są limfocyty o właściwościach cytotoksycznych. Ogromny przełom w immunoterapii nowotworów został osiągnięty z wykorzystaniem limfocytów T modyfikowanych CAR. Do tej pory najintensywniej badanym oraz najbardziej obiecującym jest CAR anty-CD19, rozpoznający antygen CD19 występujący na powierzchni komórek nowotworowych wywodzących się z limfocytów B. Niewątpliwą zaletą CD19 w terapii celowanej jest ograniczone występowanie tej cząsteczki do limfocytów B i nowotworów wywodzących się z tych komórek. W 2017 roku terapia z wykorzystaniem limfocytów CD19 CAR-T została zaakceptowana przez FDA jako pierwsza z terapii genowych/adoptywnych do leczenia dzieci i młodych dorosłych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ALL – *acute lymphoblastic leukemia*) wywodzącą się z limfocytów B [29]. Ponadto w tym samym roku terapię CD19 CAR-T zarejestrowano do leczenia niektórych typów chłoniaków niehodgkinowskich (NHL – *non-Hodgkin lymphoma*) [10].



Rycina 2. Schematyczne przedstawienie poszczególnych generacji cząsteczek CAR. Zmodyfikowano na podstawie [31].

Komórki NK ze względu na swoje zdolności cytotoksyczne są komórkami, które mogą być potencjalnie stosowane w terapii CAR. Chociaż komórki NK są mniej podatne na modyfikacje genetyczne niż limfocyty T oraz wykazują mniejszy potencjał proliferacyjny, to ich wykorzystanie w terapii CAR może mieć pewne zalety. Komórki NK mają różne receptory aktywujące, przez które mogą wywierać efekt cytotoksyczny względem komórek nowotworowych, niezależnie od aktywacji CAR. Zyskuje to szczególnie na znaczeniu w sytuacji, kiedy na komórkach nowotworowych dochodzi do obniżenia ilości cząsteczek rozpoznawanych przez CAR, np. CD19 [32], i w konsekwencji do upośledzenia cytotoksycznego działania limfocytów CAR-T.

Znacznym utrudnieniem do stosowania pierwotnych komórek NK w terapii CAR jest duża trudność ich modyfikacji. Z tego względu atrakcyjną opcją jest wykorzystanie linii komórkowych wywodzących się z komórek NK w immunoterapii nowotworów. Najbardziej zaawansowane badania dotyczą linii komórkowej NK-92 modyfikowanej CAR [33, 34, 35, 36]. Linia ta w przeciwieństwie do komórek pierwotnych, stosunkowo łatwo poddaje się modyfikacji przy użyciu transdukcji retro- lub lentiwirusowej i może być namnażana na dużą skalę [37]. Znaczną zaletą w wykorzystaniu komórek NK-92 w terapii CAR jest możliwość uzyskania wystandaryzowanego produktu. Komórki NK-92 CAR są obecnie testowane w badaniach klinicznych I i II fazy (tabela 1).

Tabela 1. Badania kliniczne z wykorzystaniem komórek CAR NK-92 (źródło: clinicaltrials.gov, dane z stycznia 2019).

Testowany CAR	Choroba	Numer badania
CD19	ostra białaczka limfoblastyczna	NCT02892695
	przewlekła białaczka limfoblastyczna	
	chłoniak grudkowy	
	chłoniak z komórek płaszczka	
	chłoniak z małych limfocytów B	
HER2	chłoniak rozlany z dużych komórek B	NCT03383978
	glejak	

Wpływ mikrośrodowiska nowotworu na terapię z wykorzystaniem CAR

Większość obecnie prowadzonych badań dotyczących komórek efektorowych modyfikowanych CAR dotyczy limfocytów T. Zastosowanie komórek CAR-T jest jednak nadal dość ograniczone w wypadku guzów litych [38], m. in. ze względu na wyjątkowo

niekorzystne warunki panujące w mikrośrodowisku nowotworu.

Wyjątek stanowią obiecujące wyniki dotyczące zastosowania limfocytów CAR-T skierowanych przeciwko disialogangliozydowi GD-2 stosowanych w leczeniu neuroblastomy, gdzie u 3 z 11 leczonych chorych udało się uzyskać całkowitą remisję [39]. Poza tymi doniesieniami limfocyty CAR-T do tej pory nie odniosły spektakularnego sukcesu w leczeniu nowotworów litych.

Ważną strategią w terapii CAR-T jest zwiększenie infiltracji komórek CAR w obrębie nowotworu. Przykładem takiego podejścia jest genetyczna modyfikacja limfocytów T jednocześnie CAR oraz receptorami dla chemokin. Przykładowo limfocyty CAR-T anty-CD30 modyfikowane receptorem CCR-4 wykazują lepszą migrację oraz bardziej skuteczną eliminację komórek nowotworowych w modelu mysim względem komórek chłoniaka Hodgkina wydzielających CCL-17 oraz CCL-22 [40]. Podobnie limfocyty CAR-T anty-GD2 z koekspresją CCR-2b wykazywały zwiększoną infiltrację względem komórek neuroblastoma, wydzielających CCL-2 [41].

Dotychczasowe obserwacje wskazują, że funkcjonowanie limfocytów T zmodyfikowanych CAR może być upośledzone pod wpływem czynników obecnych w środowisku nowotworu. Wykazano, że limfocyty CD19 CAR-T mogą być na przykład hamowane w wyniku aktywnościIDO katalizującego degradację tryptofanu do kynureniny [42]. Wykazano, że komórki CD19 CAR-T nie są w stanie zahamować proliferacji komórek nowotworowych wytwarzającychIDO, a sama akumulacja produktów szlaku kynureinowego prowadzi do upośledzenia cytotoksyczności i wytwarzania cytokin przez komórki CAR-T [42].

Stres oksydacyjny w mikrośrodowisku nowotworu i jego wpływ na aktywność komórek NK

Stres oksydacyjny jest jednym z wielu czynników obecnych w mikrośrodowisku mogących nasilać proces nowotworzenia [28]. Reaktywne formy tlenu (ROS – *reactive oxygen species*) są wytwarzane przez wszystkie komórki eukariotyczne jako element fizjologicznych procesów metabolicznych i uczestniczą w przekazywaniu sygnałów w wielu procesach komórkowych. Do stresu oksydacyjnego dochodzi wówczas, gdy równowaga między powstawaniem ROS a mechanizmami antyoksydacyjnymi jest zachwiana i przesunięta w kierunku zwiększonej generacji ROS. Niektóre z nowotworowych linii komórkowych produkują znaczne

ilości nadtlenu wodoru (H_2O_2) [29]. Uważa się, że powstawanie znacznej ilości ROS w komórkach nowotworowych może wynikać przede wszystkim ze zwiększonej aktywności metabolicznej komórek, dysfunkcji mitochondriów, nasilonego przekazywania sygnałów wewnątrz komórek [22]. Co więcej sama transformacja nowotworowa może przyczyniać się do zwiększonego wytwarzania ROS [23, 24]. Warto wspomnieć, że MDSC obecne w guzach nowotworowych mogą być w znacznej mierze źródłem ROS [12]. Należy także podkreślić, że stosowane leki przeciwnowotworowe mogą indukować stres oksydacyjny. Do znanych związków o wysokiej zdolności do wytwarzania ROS należą przede wszystkim, antracykliny (np. doksorubicyna, epirubicyna, daunorubicyna), leki alkilujące, kompleksy platyny (np. cisplatyna, oksaliplatyna, karboplatyna), pochodne podofilotoksyny (np. etopozyd czy tenipozyt) oraz związki z grupy inhibitorów topoisomerazy (np. topotekan czy irynotekan) [28]. Oprócz wymienionych powyżej przyczyn do źródeł mitochondrialnych oraz cytoplazmatycznych ROS należy zaliczyć radioterapię, promieniowanie UV czy długo utrzymujący się stan zapalny.

Przewlekły stres oksydacyjny wpływa na różne etapy powstawania i rozwoju nowotworu. Uszkodzenia DNA indukowane przez ROS odgrywają rolę zarówno w inicjacji procesu nowotworzenia, jak i transformacji nowotworowej [43, 44, 45]. Zwiększona produkcja ROS przyczynia się do większej niestabilności genomowej i powstawania dużej ilości mutacji w komórkach nowotworowych [46]. Ponadto ROS powodują zaburzenia w szlakach przekazywania sygnałów w komórkach. Przykładowo, w raku piersi ROS poprzez oksydacyjną inaktywację niektórych białek np. PTPs, PTEN oraz CDC25A, prowadzą do aktywacji szlaku AKT i ERK, powodując tym samym aktywację czynników transkrypcyjnych, takich jak NRF-1, Jab1, p27, które wpływają na regulację genów odpowiedzialnych za cykl komórkowy, promując tym samym wzrost komórek nowotworowych [47]. Konstytutywnie źródłem ROS w komórkach nowotworowych mogą być zmutowane onkogeny, w szczególności Ras oraz Myc, których ilość jest zwiększona w różnych typach nowotworów [48, 49]. Pod wpływem ROS może dochodzić do inaktywacji czynników transkrypcyjnych STAT (*signal transducer and activator of transcription*) w skutek utlenienia reszt cysteiny [50].

Wysokie stężenie ROS może prowadzić do nekrotycznej śmierci komórek, również komórek układu odpornościowego. Istnieją jednak pewne stężenia, w których limfocyty T w wyniku stresu oksydacyjnego indukowanego przez neutrofile, nadal przeży-

wają, lecz ich funkcje są ograniczone [51, 52]. Z kolei wpływ stresu oksydacyjnego na komórki NK nie został do tej pory dostatecznie zbadany. Dostępne dane literaturowe wskazują, że pod wpływem ROS wytwarzanych przez komórki mieloidalne, takie jak granulocyty [53] oraz monocyty [54] dochodzi do zahamowania naturalnej cytotoksyczności komórek NK. Dodatkowo wykazano, że w wyniku aktywacji monocytów przez przeciwciała monoklonalne anti-CD20 dochodzi do wytwarzania ROS, które hamują cytotoksyczność komórek NK zależną od rytuksymabu czy ofatumumabu względem komórek przewlekłej białaczki limfocytowej (CLL – *chronic lymphocytic leukemia*) oraz indukują apoptozę komórek NK [55]. Pod wpływem ROS wytwarzanych przez komórki żerne dochodzi również do selektywnego obniżenia na powierzchni komórek CD56^{dim} ilości receptorów o charakterze aktywującym Nkp46 oraz NKG2D, czego nie zaobserwowano dla komórek CD56^{bright} [56]. Okazuje się, że nie wszystkie subpopulacje komórek NK są jednakowo podatne na hamujące działanie stresu oksydacyjnego. Przeprowadzone równoległe badania przez dwa zespoły naukowe wykazały, że komórki CD56^{bright} lepiej przeżywają w warunkach stresu oksydacyjnego w porównaniu do bardziej dojrzałej populacji komórek CD56^{dim} [57, 58]. Wykazano również, że komórki CD56^{bright} są w stanie bardziej wydajnie neutralizować H_2O_2 niż komórki CD56^{dim}, co powiązano z większą powierzchnią ekspresją tioli [58]. Interesującą obserwację poczyniono u chorych z rakiem przełyku oraz żołądka, gdzie zaobserwowano, że ilość komórek CD56^{dim} wśród limfocytów naciekających nowotwór odwrotnie koreluje z produkcją ROS przez komórki mieloidalne CD14+ [59]. Może to pośrednio wskazywać na obniżoną tolerancję stresu oksydacyjnego przez komórki CD56^{dim}.

ROS powstają w komórkach, głównie w mitochondriach, jako półprodukty wytwarzania energii w łańcuchu oddechowym, ale mogą być również produkowane niezależnie, przez enzymy z grupy oksydaz NADPH (NOX1-5). Wszystkie enzymy NOX wykazują duże podobieństwo w budowie i funkcji, jednak różnią się występowaniem. NOX2 jest ograniczone w znacznej mierze do komórek linii mieloidalnej: monocytów, makrofagów oraz granulocytów i odpowiada za wytwarzanie ROS w odpowiedzi na patogeny. W badaniach na zwierzętach wykazano, że myszy z usuniętym genem dla NOX2 wykazują mniejszą tendencję do tworzenia przerzutów w modelu czerniaka. Podobny efekt uzyskano z zastosowaniem inhibitora NOX2. Wydaje się, że zahamowanie NOX2, a tym samym ograniczenie wytwarzania ROS przez komórki mieloidalne ułatwia eliminację komórek nowotworowych czerniaka przez komórki NK [60].

Zasadność strategii mającej na celu ochronę komórek przed działaniem stresu oksydacyjnego wykazano również w wypadku limfocytów CAR-T. W niedawno opublikowanej pracy limfocyty T modyfikowano plazmidem bicistronowym zawierającym sekwencje kodujące dla CAR oraz katalazy [61]. Wykazano, że limfocyty CAR-T z koekspresją katalazy (CAR-CAT T) wykazują lepszą przeżywalność w obecności H_2O_2 oraz wykazują większą cytotoxyczność względem komórek nowotworowych w porównaniu do komórek kontrolnych. Zaobserwowano również, że obecność limfocytów CAR-CAT T wywiera ochronny efekt względem innych komórek układu odpornościowego, komórek NK i limfocytów T [61].

Pomimo dotychczasowych sukcesów na polu terapii z wykorzystaniem CAR, zastosowanie komórek modyfikowanych CAR nadal nie przynosi dostatecznie satysfakcjonujących rezultatów w wypadku nowotworów litych [62, 63]. Przyczyn jest wiele, poczynając od tego, że limfocyty CAR muszą otrzymać odpowiedni sygnał chemotaktyczny do efektywnej infiltracji nowotworu, która jest utrudniona ze względu na niefizjologiczny rozwój unaczynienia guza, obecność barier fizycznych w postaci komórek podścieliska oraz naciekających komórek o charakterze supresorowym, po obecność stresu oksydacyjnego oraz szeregu metabolitów i cytokin [62, 63]. Dlatego nadal istnieje potrzeba poszukiwania nowych sposobów ulepszenia terapii adoptywnych, w szczególności terapii opartych o zastosowanie komórek NK, co zostało podjęte w projekcie doktorskim.

WNIOSKI

Czynniki immunosupresyjne obecne w mikrośrodku nowotworu umożliwiają komórkom nowotworowym unikanie odpowiedzi immunologicznej i tym samym sprzyjają rozwojowi nowotworu. Jednym z istotnych elementów środowiska nowotworu, który może wpływać na komórki układu odpornościowego jest nadmierny stres oksydacyjny. W ostatnich latach zastosowanie komórek układu odpornościowego, w tym komórek NK i CAR-NK, w adoptywnej terapii chorób nowotworowych zyskuje na znaczeniu. Doniesienia literaturowe wskazują, że komórki NK należą do komórek o zwiększonej wrażliwości na stres oksydacyjny. Wychodząc naprzeciw istotnym problemom współczesnej immunoterapii nowotworów w pracy doktorskiej realizowanej przy współfinansowaniu w ramach stypendium naukowego przyznanego przez Naukową

Fundację Polpharmy, podjęto się zbadania mechanizmów obrony komórek NK przed stresem oksydacyjnym oraz opracowania strategii zmniejszających wrażliwość komórek NK na stres oksydacyjny. W trakcie realizacji projektu doktorskiego zaobserwowano, że komórki NK są szczególnie wrażliwą populacją limfocytów na działanie stresu oksydacyjnego. Podczas poszukiwania mechanizmów obrony antyoksydacyjnej komórek NK skupiono się na układzie enzymów antyoksydacyjnych PRDX1-TXN1-TXNRD1, który tworzą peroksyredoksyna 1 (PRDX1) wraz z dwoma innymi enzymami zależnymi od grup tiolowych: tioredoksyną 1 (TXN1) oraz reduktazą tioredoksyny 1 (TXNRD1). Układ ten uczestniczy w usuwaniu H_2O_2 z komórek, chroniąc je przed jego szkodliwym działaniem. Wykazano, że manipulacja genetyczna prowadząca do zwiększenia ilości wybranych enzymów antyoksydacyjnych, m.in. peroksyredoksyny 1 w komórkach NK znacznie poprawia ich przeżycie w niekorzystnych warunkach stresu oksydacyjnego. Wprowadzenie PRDX1 do komórek NK przekłada się również na lepsze przeżycie pierwotnych komórek CAR NK w warunkach stresu oksydacyjnego.

Zapoznanie się ze szczegółowymi wynikami przeprowadzonych badań będzie wkrótce możliwe po opublikowaniu uzyskanych wyników w czasopiśmie poświęconym tematyce immunoterapii nowotworów.

DALSZE KIERUNKI BADAŃ

Problematyka poruszona w pracy wskazuje na znaczenie nowego kierunku badań, mającego na celu poprawę funkcjonowania limfocytów cytotoxycznych w niekorzystnych warunkach mikrośrodowiska nowotworu. W niniejszej pracy skupiono się na wybranym elemencie mikrośrodowiska nowotworu jakim jest stres oksydacyjny oraz jego szczególnie hamującym wpływie na aktywność komórek NK oraz komórek CAR-NK. W pracy wykorzystano uproszczone modele indukcji stresu oksydacyjnego, z tego względu planowane jest poszerzenie badań i przeprowadzenie doświadczeń w mysich modelach *in vivo*. Ponadto podjęcie powyższej tematyki wyznacza dalsze ścieżki badawcze, prowadzące do identyfikacji innych niekorzystnych czynników panujących w mikrośrodku nowotworu oraz poszukiwanie sposobów poprawiających funkcjonowanie limfocytów cytotoxycznych w tych warunkach. Poszerzenie wiedzy w tym obszarze może w przyszłości przyczynić się do lepszego wykorzystania immunoterapii w leczeniu nowotworów.

PIŚMIENICTWO

1. Gołęb J, J.M., Lasek W, Stokłosa T, *Immunologia*. Wydawnictwo PWN, Warszawa: 2014.
2. Kiessling, R., et al., "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol*, 1975. 5(2): p. 117-21.
3. Kiessling, R., E. Klein, and H. Wigzell, "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, 1975. 5(2): p. 112-7.
4. Gardiner, C.M. and K.H. Mills, *The cells that mediate innate immune memory and their functional significance in inflammatory and infectious diseases*. *Semin Immunol*, 2016. 28(4): p. 343-50.
5. Bjorkstrom, N.K., et al., *Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus*. *J Exp Med*, 2011. 208(1): p. 13-21.
6. Sun, J.C., J.N. Beilke, and L.L. Lanier, *Adaptive immune features of natural killer cells*. *Nature*, 2009. 457(7229): p. 557-61.
7. Ferlazzo, G., et al., *The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic*. *J Immunol*, 2004. 172(3): p. 1455-62.
8. Fehniger, T.A., et al., *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity*. *Blood*, 2003. 101(8): p. 3052-7.
9. Freud, A.G. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development*. *Immunol Rev*, 2006. 214: p. 56-72.
10. <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm581216.htm>.
11. Wang, W., et al., *NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy*. *Front Immunol*, 2015. 6: p. 368.
12. Bauer, K., et al., *Rituximab, ofatumumab and other monoclonal anti-CD20 antibodies for chronic lymphocytic leukaemia*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012. 11: p. CD008079.
13. Golay, J., et al., *Glycoengineered CD20 antibody obinutuzumab activates neutrophils and mediates phagocytosis through CD16B more efficiently than rituximab*. *Blood*, 2013. 122(20): p. 3482-91.
14. Nakajima, T., et al., *Surface markers of NK cells in peripheral blood of patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma*. *Immunol Lett*, 1986. 13(1-2): p. 7-10.
15. Aktas, O.N., et al., *Role of natural killer cells in lung cancer*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2018. 144(6): p. 997-1003.
16. Schantz, S.P., et al., *Natural killer cell activity and head and neck cancer: a clinical assessment*. *J Natl Cancer Inst*, 1986. 77(4): p. 869-75.
17. Strayer, D.R., W.A. Carter, and I. Brodsky, *Familial occurrence of breast cancer is associated with reduced natural killer cytotoxicity*. *Breast Cancer Res Treat*, 1986. 7(3): p. 187-92.
18. Hersey, P., et al., *Low natural-killer-cell activity in familial melanoma patients and their relatives*. *Br J Cancer*, 1979. 40(1): p. 113-22.
19. Imai, K., et al., *Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population*. *Lancet*, 2000. 356(9244): p. 1795-9.
20. Orange, J.S., *Natural killer cell deficiency*. *J Allergy Clin Immunol*, 2013. 132(3): p. 515-525.
21. Ruggeri, L., et al., *Effectiveness of donor natural killer cell allo-reactivity in mismatched hematopoietic transplants*. *Science*, 2002. 295(5562): p. 2097-100.
22. Angelo, L.S., et al., *Practical NK cell phenotyping and variability in healthy adults*. *Immunol Res*, 2015. 62(3): p. 341-56.
23. Almasbakh, H., et al., *Transiently redirected T cells for adoptive transfer*. *Cytherapy*, 2011. 13(5): p. 629-40.
24. Ando, T., et al., *Transduction with the antioxidant enzyme catalase protects human T cells against oxidative stress*. *J Immunol*, 2008. 181(12): p. 8382-90.
25. Becknell, B. and M.A. Caligiuri, *Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells*. *Adv Immunol*, 2005. 86: p. 209-39.
26. Barrett, D.M., et al., *Treatment of advanced leukemia in mice with mRNA engineered T cells*. *Hum Gene Ther*, 2011. 22(12): p. 1575-86.
27. Azzam, E.I., J.P. Jay-Gerin, and D. Pain, *Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury*. *Cancer Lett*, 2012. 327(1-2): p. 48-60.
28. Abbas, K., et al., *Signaling events leading to peroxiredoxin 5 up-regulation in immunostimulated macrophages*. *Free Radic Biol Med*, 2009. 47(6): p. 794-802.
29. <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm574058.htm>.
30. Sadelain, M., R. Brentjens, and I. Riviere, *The basic principles of chimeric antigen receptor design*. *Cancer Discov*, 2013. 3(4): p. 388-98.
31. Dotti, G., et al., *Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells*. *Immunol Rev*, 2014. 257(1): p. 107-26.
32. Sotillo, E., et al., *Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 Immunotherapy*. *Cancer Discov*, 2015. 5(12): p. 1282-95.
33. Zhang, C., et al., *Chimeric Antigen Receptor-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cellular Therapeutic for Targeted Elimination of Cancer Cells and Induction of Protective Antitumor Immunity*. *Front Immunol*, 2017. 8: p. 533.
34. Romanski, A., et al., *CD19-CAR engineered NK-92 cells are sufficient to overcome NK cell resistance in B-cell malignancies*. *J Cell Mol Med*, 2016. 20(7): p. 1287-94.
35. Oelsner, S., et al., *Continuously expanding CAR NK-92 cells display selective cytotoxicity against B-cell leukemia and lymphoma*. *Cytherapy*, 2017. 19(2): p. 235-249.

36. Han, J., et al., *CAR-Engineered NK Cells Targeting Wild-Type EGFR and EGFRvIII Enhance Killing of Glioblastoma and Patient-Derived Glioblastoma Stem Cells*. Sci Rep, 2015. 5: p. 11483.
37. Boissel, L., et al., *Comparison of mRNA and lentiviral based transfection of natural killer cells with chimeric antigen receptors recognizing lymphoid antigens*. Leuk Lymphoma, 2012. 53(5): p. 958-65.
38. Xu, J., et al., *Chimeric antigen receptor-T cell therapy for solid tumors require new clinical regimens*. Expert Rev Anticancer Ther, 2017. 17(12): p. 1099-1106.
39. Louis, C.U., et al., *Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma*. Blood, 2011. 118(23): p. 6050-6.
40. Di Stasi, A., et al., *T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model*. Blood, 2009. 113(25): p. 6392-402.
41. Craddock, J.A., et al., *Enhanced tumor trafficking of GD2 chimeric antigen receptor T cells by expression of the chemokine receptor CCR2b*. J Immunother, 2010. 33(8): p. 780-8.
42. Ninomiya, S., et al., *Tumor indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibits CD19-CAR T cells and is downregulated by lymphodepleting drugs*. Blood, 2015. 125(25): p. 3905-16.
43. Fruehauf, J.P. and F.L. Meyskens, Jr., *Reactive oxygen species: a breath of life or death?* Clin Cancer Res, 2007. 13(3): p. 789-94.
44. Caputo, F., R. Vegliante, and L. Ghibelli, *Redox modulation of the DNA damage response*. Biochem Pharmacol, 2012. 84(10): p. 1292-306.
45. Ziech, D., et al., *Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis*. Mutat Res, 2011. 711(1-2): p. 167-73.
46. Sallmyr, A., J. Fan, and F.V. Rassool, *Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair*. Cancer Lett, 2008. 270(1): p. 1-9.
47. Okoh, V.O., et al., *Redox signalling to nuclear regulatory proteins by reactive oxygen species contributes to oestrogen-induced growth of breast cancer cells*. Br J Cancer, 2015. 112(10): p. 1687-702.
48. Weyemi, U., et al., *ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence*. Oncogene, 2012. 31(9): p. 1117-29.
49. Maya-Mendoza, A., et al., *Myc and Ras oncogenes engage different energy metabolism programs and evoke distinct patterns of oxidative and DNA replication stress*. Mol Oncol, 2015. 9(3): p. 601-16.
50. Bourgeais, J., V. Gouilleux-Gruart, and F. Gouilleux, *Oxidative metabolism in cancer: A STAT affair?* JAKSTAT, 2013. 2(4): p. e25764.
51. Cemerski, S., et al., *Reactive oxygen species differentially affect T cell receptor-signaling pathways*. J Biol Chem, 2002. 277(22): p. 19585-93.
52. Schmielau, J. and O.J. Finn, *Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients*. Cancer Res, 2001. 61(12): p. 4756-60.
53. Mellqvist, U.H., et al., *Natural killer cell dysfunction and apoptosis induced by chronic myelogenous leukemia cells: role of reactive oxygen species and regulation by histamine*. Blood, 2000. 96(5): p. 1961-8.
54. Hansson, M., et al., *Induction of apoptosis in NK cells by monocyte-derived reactive oxygen metabolites*. J Immunol, 1996. 156(1): p. 42-7.
55. Werlenius, O., et al., *Reactive oxygen species induced by therapeutic CD20 antibodies inhibit natural killer cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against primary CLL cells*. Oncotarget, 2016. 7(22): p. 32046-53.
56. Romero, A.I., et al., *NKp46 and NKG2D receptor expression in NK cells with CD56dim and CD56bright phenotype: regulation by histamine and reactive oxygen species*. Br J Haematol, 2006. 132(1): p. 91-8.
57. Harlin, H., et al., *The CD16- CD56(bright) NK cell subset is resistant to reactive oxygen species produced by activated granulocytes and has higher antioxidative capacity than the CD16+ CD56(dim) subset*. J Immunol, 2007. 179(7): p. 4513-9.
58. Thoren, F.B., et al., *The CD16-/CD56bright subset of NK cells is resistant to oxidant-induced cell death*. J Immunol, 2007. 179(2): p. 781-5.
59. Izawa, S., et al., *H(2)O(2) production within tumor microenvironment inversely correlated with infiltration of CD56(dim) NK cells in gastric and esophageal cancer: possible mechanisms of NK cell dysfunction*. Cancer Immunol Immunother, 2011. 60(12): p. 1801-10.
60. Aydin, E., et al., *Role of NOX2-Derived Reactive Oxygen Species in NK Cell-Mediated Control of Murine Melanoma Metastasis*. Cancer Immunol Res, 2017. 5(9): p. 804-811.
61. Ligtenberg, M.A., et al., *Coexpressed Catalase Protects Chimeric Antigen Receptor-Redirected T Cells as well as Bystander Cells from Oxidative Stress-Induced Loss of Antitumor Activity*. J Immunol, 2016. 196(2): p. 759-66.
62. Diet, A., et al., *Regulation of peroxiredoxins by nitric oxide in immunostimulated macrophages*. J Biol Chem, 2007. 282(50): p. 36199-205.
63. Bellone, G., et al., *Regulation of NK cell functions by TGF-beta I*. J Immunol, 1995. 155(3): p. 1066-73.

Naturalne terpeny jako substancje o wielokierunkowej aktywności biologicznej

Natural terpenes as substances with multidirectional biological activities

Karolina A.
Wojtunik-Kulesza,
Monika Waksmundzka-
Hajnos

Zakład Chemii Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem
Analityki Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Przedstawione wyniki badań zostały wsparte finansowo przez Naukową
Fundację Polfarmy (stypendium naukowe dla doktorantów).

Streszczenie

Terpeny, wtórne metabolity roślinne, od wielu lat są przedmiotem zainteresowań naukowców na całym świecie. Wielokierunkowa aktywność biologiczna tych substancji zachęca do poszukiwania pośród nich związków o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu wielu chorób, jak neurodegeneracyjne czy cukrzyca. W niniejszej pracy zostanie przedstawione zagadnienie choroby Alzheimera oraz cukrzycy, w kierunku których zostanie przeanalizowana aktywność biologiczna naturalnych terpenów. Dostępne wyniki badań wskazują na ich zadowalającą aktywność antyoksydacyjną oraz inhibicyjną w kierunku m.in. AChE, BuChE (choroba Alzheimera) oraz α -amylazy i α -glukozydazy (cukrzyca). Przedmiotem badań są zarówno złożone olejki eteryczne, takie jak szalwiowy, rozmarynowy, bazyliowy czy z melisy, będące źródłem naturalnych terpenów, jak też ich pojedyncze składniki. Szczególną wagę przywiązuje się do monoterpenów, które stanowią główne składniki wielu olejków eterycznych. Spośród przedstawionych w pracy monoterpenów na szczególną uwagę zasługują substancje takie jak: ocymen, karwon, pulegon, α -felandren, które wykazują zarówno zdolność zmiatania wolnych rodników, jak też inhibicję AChE i BuChE, a także α -pinen, cytal, limonen wykazujące zdolność hamowania α -amylazy i α -glukozydazy.

Słowa kluczowe: terpeny, Alzheimer, AChE, antyoksydanty, α -amylaza, α -glukozydaza

Abstract

Terpenes, secondary metabolites, are considered by scientists around the World. Multidirectional biological activities of these substances encourage researchers to their detail analysis towards numerous diseases such as neurodegenerative or metabolic. In the presented paper, authors have focused on Alzheimer's disease and diabetes as potential direction of terpenes' activity. According to available literature, terpenes exhibit satisfactory antioxidant activity and ability to inhibition AChE, BuChE (Alzheimer's disease) and α -amylase, α -glucosidase (diabetes). Basis of the presented research are both essential oils obtained from plants such as salvia, rosemary, basil and lemon balm being one of the main source of natural terpenes, and single compounds. Special attention is paid to monoterpenes as the main components of numerous essential oils.

Wpłynęło: 10-01-2019
Zaakceptowano: 10-05-2019
Opublikowano: 20-05-2019

Adres do korespondencji
mgr Karolina A. Wojtunik-Kulesza,
Collegium Pharmaceuticum,
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4a, 20-093 Lublin,
e-mail: karolina.wojtunik@umlub.pl

Among terpenes presented in the paper, activity of ocimene, carvone, pulegone, α -phellandrene exhibiting activity towards both free radical scavenging as well as AChE and BuChE inhibition, and α -pinene, citral, limonene that revealing inhibitory activity towards α -amylase and α -glucosidase should be emphasized.

Keywords: terpenes, Alzheimer, AChE, antioxidants, α -amylase, α -glucosidase

WSTĘP

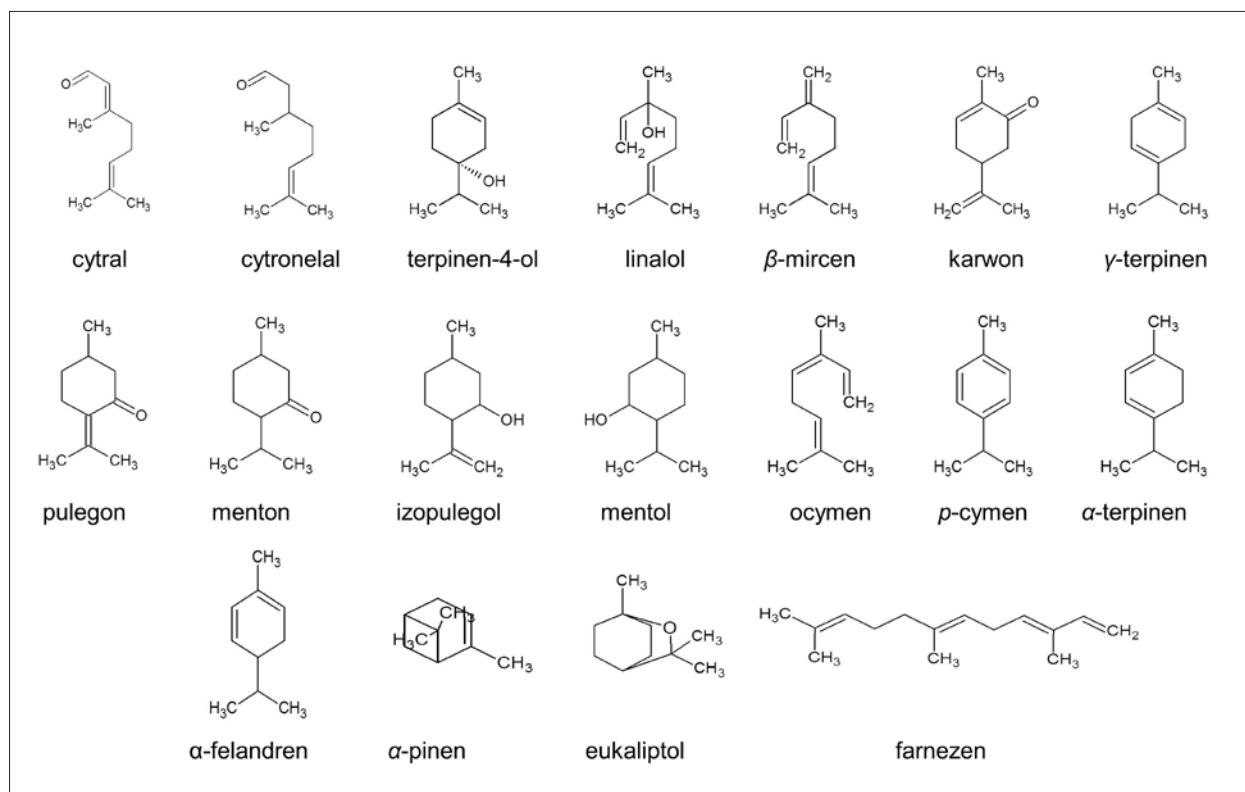
Terpeny, grupa wtórnych metabolitów roślinnych, jest szczegółowo badana w kierunku ich szerokiego spektrum właściwości biologicznych, które powszechnie wykorzystywane jest w farmacji. Jednym z najczęściej badanych kierunków aktywności substancji naturalnych są właściwości antyoksydacyjne oraz hamujące enzymy, takie jak acetylo- i butyrylocholinoesterazę (choroba Alzheimera) oraz α -amylazę i α -glukozydazę (cukrzyca).

Choroba Alzheimera (ang. *Alzheimer's disease*, AD) została opisana po raz pierwszy w 1906 r. przez niemieckiego psychiatrę Alojzego Alzheimera. Przeprowadzone przez niego badania *post mortem* mózgu chorej kobiety ujawniły obecność specyficznych zewnątrzkomórkowych struktur, będących złogami białka β -amyloidu, tworzących płytki starcze oraz wewnątrzkomórkowych splątków neurofibrylarnych, będących kompleksami hiperfosforylowanego białka tau [1]. Wieloletnie badania nad tym schorzeniem dowiodły jednak, że oprócz wspomnianych struktur, AD jest również związana ze zmniejszoną ilością neuroprzekaźnika acetylocholino (ACh), stresem oksydacyjnym czy zwiększonym napływem jonów wapnia do neuronów [2]. Wielu uczonych podkreśla także fakt, że obserwowane zmiany w mózgu mogą być nie tylko przyczyną schorzenia, ale także mogą pojawiać się jako następstwo jego rozwoju. Pomimo wieloletnich badań naukowcy nie wskazali jednoznacznie, który z czynników chorobotwórczych ma dominujący wpływ na jego rozwój. Biorąc pod uwagę wieloczynnikowy charakter AD, najkorzystniejszym rozwiązaniem w walce z chorobą jest zatem znalezienie substancji aktywnej jednocześnie w kierunku większości przyczyn choroby [3].

Obecnie dostępna terapia skupia się na jednej z przyczyn choroby, mianowicie zmniejszonej ilości neuroprzekaźnika ACh. Agencja Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) dopuściła leki oparte na inhibitorach acetylocholinoeste-

razy (AChE) oraz antagoniście receptora N-metylo-D-asparagianu (NMDA) [4, 5, 6]. Substancje te działają jednokierunkowo, nie wpływając na inne przyczyny choroby. Jak podaje literatura, długotrwałe przyjmowanie tych substancji negatywnie wpływa na organizm. Pacjenci odczuwają bóle głowy, nudności, zaburzenia orientacji, co jest bardzo uciążliwe zarówno dla pacjentów, jak i opiekunów. Uwaga naukowców skupiona jest więc na znalezieniu substancji działającej wielopłaszczyznowo, która jednocześnie nie będzie negatywnie wpływała na organizm.

Podobnie, jak w przypadku choroby Alzheimera, intensywne badania trwają nad poszukiwaniem leków skutecznych w walce z cukrzycą. Jak pokazują statystyki, choroba ta jest coraz częściej spotykana w naszym społeczeństwie i obecnie na całym świecie cierpi na nią ok. 350 mln ludzi. Wiemy, że jest to przewlekła choroba metaboliczna, której podstawą jest zmniejszenie wrażliwości na insulinę lub zaburzenie jej wytwarzania, której ilość nie wystarcza do prawidłowego metabolizmu cukrów [7]. W zależności od typu cukrzycy leczenie opiera się na przyjmowaniu doustnych leków przeciwcukrzycowych bądź insuliny w formie iniekcji. W obydwu przypadkach nieodzowna jest ścisła kontrola poziomu cukru we krwi, zmiana diety oraz aktywność fizyczna [8]. Od wielu lat trwają badania w kierunku udoskonalenia leczenia farmakologicznego. Jak pokazują badania, zmniejszenie trawienia węglowodanów złożonych pozytywnie wpływa na zmniejszenie ilości przyswajalnej glukozy, co przekłada się na normalizację poziomu tego cukru prostego we krwi. Uwaga naukowców skupiona jest więc na znalezieniu substancji będącej inhibitorem enzymów α -amylazy i α -glukozydazy odpowiedzialnych za rozkład cukrów złożonych do najprostszej formy jaką jest glukoza [9]. Obecnie stosowane leki nie stanowią możliwie najlepszego rozwiązania ze względu na skutki uboczne dotyczące układu pokarmowy. Odwracalne zahamowanie aktywności enzymów pozytywnie wpłynie na poziom glukozy we krwi.



Rycina 1. Przykłady terpenów, których aktywność biologiczna została przedstawiona w pracy.

Obecnym trendem w poszukiwaniu substancji leczniczych są olejki eteryczne wielu gatunków roślin. Jak pokazują badania, świat roślin jest niewyczerpalnym źródłem substancji aktywnych, będących podstawowym składnikiem szerokiej grupy obecnie stosowanych środków leczniczych. W przedstawionej pracy skupiono się na terpenach, wtórnych metabolitach roślinnych, wykazujących wielopłaszczyznową aktywność biologiczną. W niniejszej pracy zostaną przedstawione badania wskazujące na aktywność tych substancji w kierunku zmiatania wolnych rodników, inhibicji acetylo- i butyrylocholinoesterazy (choroba Alzheimera) oraz α -amylazy i α -glukozydazy (cukrzyca).

TERPENY JAKO WTÓRNE METABOLITY ROŚLINNE

Naturalne terpeny stanowią największą grupę wtórnych metabolitów roślinnych. Dotychczas poznano i opisano ok. 50 tys. tych związków [10]. Ich głównym źródłem są olejki eteryczne wielu gatunków roślin. Jak pokazały badania, rodzina *Lamiaceae* jest jednym z najbogatszych źródeł monotrpenów. Warto wspomnieć tutaj o olejkach z roślin, takich jak melisa lekarska, mięta pieprzowa czy bazylija pospolita będące źródłem terpenów, takich jak menton, mentol, pulegon, karwon, izopulegol, linalol i wielu innych [11].

Większość terpenów można przedstawić za pomocą ogólnego wzoru $(C_5H_8)_n$, gdzie n oznacza liczbę połączonych ze sobą jednostek izoprenowych [12]. Podstawowe grupy terpenów to:

- hemiterpeny (C_5H_8), np. izopren
- monotrpeny ($C_{10}H_{16}$), np. limonen
- seskwiterpeny ($C_{15}H_{24}$), np. farnezen
- diterpeny ($C_{20}H_{32}$), np. fitol
- sesterpeny ($C_{25}H_{40}$), np. ophiobolin
- triterpeny ($C_{30}H_{48}$), np. lanosterol
- tetraterpeny ($C_{40}H_{64}$), np. grupa karotenoidów
- politerpeny (C_5H_8)_n, np. gutaperka

Do grupy terpenów należą zarówno węglowodory, jak też ich pochodne, czyli alkohole, aldehydy i ketony określane wspólną nazwą terpenoidów. Rysunek 1. przedstawia przykłady terpenów, których aktywność została opisana w niniejszej pracy. Duża różnorodność strukturalna terpenów wpływa na ich szerokie spektrum aktywności biologicznej. Warto wymienić tutaj aktywność przeciwzapalną, uspokajającą, przeciwgrzybiczą i przeciwdrobnoustrojową [13, 14, 15].

Charakterystyczną cechą terpenów jest także ich zdolność przenikania przez skórę, co wynika z ich wysokiej lipofilowości. Substancje te, w tym m.in. linalol, mentol, karwon i eukaliptol, wykorzystywane są w stymulacji transdermalnej leków [16].

WIELOKIERUNKOWA AKTYWNOŚĆ TERPENÓW

Aktywność antyoksydacyjna

Jedną z najczęściej badanych aktywności substancji naturalnych jest ich zdolność zmiatania wolnych rodników. Jak powszechnie wiadomo, te reaktywne cząsteczki negatywnie wpływają na cały organizm, który ustawicznie przeciwdziała ich kumulowaniu się [17]. Pomimo endogennych mechanizmów obronnych organizmu, jak enzymy antyoksydacyjne, często dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy wytwarzaniem wolnych rodników i ich usuwaniem przez organizm. Zjawisko to, zwane stresem oksydacyjnym, negatywnie oddziałuje na wszystkie komórki organizmu. Warto wspomnieć o jego wpływie na zwiększenie przepuszczalności błony plazmatycznej, uszkodzeniach morfologicznych komórek i DNA, obniżeniu poziomu ATP czy peroksydacji lipidów [18]. Szczególnie narażonym na działanie wolnych rodników jest mózg, co wynika z wysokiego stężenia jonów metali, będących katalizatorem reakcji wolnorodnikowych [19]. Jak pokazują badania, stres oksydacyjny ma wpływ na rozwój wielu chorób, w tym choroby Alzheimera [20]. Pożądane jest zatem, aby substancje aktywne w walce z tym schorzeniem wykazywały aktywność przeciwrodnikową.

Będąc podstawą niniejszej pracy naturalne terpeny, a także olejki eteryczne, których głównymi składnikami są wspomniane substancje, wykazują wysoką aktywność antyoksydacyjną. W wielu przypadkach głównymi składnikami dużej grupy olejków eterycznych są monoterpény, którym przypisuje się zdolność zmiatania wolnych rodników. Wielu badaczy przypisuje także stosunkowo wysoką aktywność antyoksydacyjną obecnym oddziaływaniom synergistycznym ich głównych składników [21]. Badania prowadzone na olejkach eterycznych wielu roślin, w tym rodziny *Lamiaceae*, ujawniły ponad dziewięćdziesięcioprocentową zdolność zmiatania wolnych rodników. Na uwagę zasługują olejki: szalwowy, rozmarynowy oraz z melisy, w których składzie możemy znaleźć m.in. linalol, mentol, pulegon oraz karwon [22, 23]. Warto wspomnieć o badaniach przeprowadzonych na wybranej grupie 18 terpenów, na podstawie których wyznaczono zależność struktura – aktywność antyoksydacyjna [24]. Jak pokazały badania, monoterpény posiadające sprzężone wiązania podwójne jak karwon, cytral, pulegon czy ocymen wykazują znacznie wyższą aktywność przeciwrodnikową niż terpeny nieposiadające tego elementu struktury. Biorąc pod uwagę ten fakt, należy także zauważyć wysoką aktywność olejków eterycznych posiadających dużą zawartość tych substancji.

Wielu badaczy skupia uwagę na analizie terpenów w kierunku zmiatania wolnych rodników oraz przeciwdziałania peroksydacji lipidów. W tym przypadku warto posłużyć się badaniami Duarte i wsp. [25]. Autorzy pracy podkreślili wysoką aktywność linalolu, który ujawnił lepszą zdolność przeciwdziałania peroksydacji lipidów niż znany silny antyoksydant BHT. Interesującymi terpenami są także α - i β -pinen, które można znaleźć w wielu gatunkach szalwii, mięty oraz w drzewach iglastych. Ważne badania zostały przedstawione przez Porres-Martínez i wsp. [17], w których poruszono udział α -pinenu w regulacji bilansu redoks w komórkach. Warto wspomnieć także o wysokiej aktywności przeciwutleniającej izomerów α - i γ -terpinenu. Badania pokazały właściwości tych substancji w stosunku do przeciwdziałania uszkodzeniom oksydacyjnym DNA oraz erytrocytów. Karwon, będący składnikiem olejku *Zanthoxylum alatum* przeciwdziała natomiast peroksydacji lipidów.

Oprócz monoterpenów na uwagę zasługują także bardziej złożone terpeny, jak seskwiterpeny. Przykładem może być farnezen, którego wysoka aktywność antyoksydacyjna przyciąga uwagę naukowców badających olejki eteryczne [24]. Jak pokazują badania *in vivo* przeprowadzone na myszach, związek ten wykazuje właściwości chroniące DNA przed uszkodzeniami oksydacyjnymi oraz zabezpiecza przed wzrostem stężenia H_2O_2 mającego toksyczny wpływ na komórki organizmu [26].

Inhibicja acetylo- i butyrylocholinoesterazy

Acetylo- i butyrylocholinoesteraza (odpowiednio AChE i BuChE) są enzymami katalizującymi hydrolizę neuroprzekaźnika acetylocholinę (ACh). W prawidłowo funkcjonującym organizmie istnieje równowaga pomiędzy wytwarzaniem neuroprzekaźnika przez neurony i jego rozkładem przez AChE. W przypadku rozwoju AD dochodzi do wymierania neuronów, co pociąga za sobą zmniejszoną ilość wytwarzanej ACh [4]. Niski poziom acetylocholinę w mózgu, będący podstawą hipotezy cholinergicznej AD, przekłada się na zaburzenia funkcji kognitywnych. Pomimo zmniejszonej ilości neuroprzekaźnika jest on nieprzerwanie rozkładany przez AChE tak, jak w prawidłowo funkcjonującym organizmie. Jednym z rozwiązań tego problemu jest zastosowanie inhibitorów enzymu, co spowolni rozkład neurotransmitera. Obecnie dostępne leki oparte są na inhibitorach AChE, np. galantaminie, jednak jak pokazują badania, substancje te nie są w pełni odwracalnymi inhibitorami, co ma negatywny wpływ na organizm [27, 28]. Celem badaczy na całym świecie jest znalezienie substancji będącej w pełni odwracalnym inhibitorem AChE, wykazującym jednocześnie

aktywność w kierunku innych możliwych przyczyn choroby.

Jedną z grup substancji naturalnych badanych w kierunku inhibicji AChE i BuChE są naturalne terpeny. Badania pokazują, że, zarówno olejki eteryczne będące złożoną mieszaniną terpenów, jak też pojedyncze związki wykazują wspomnianą aktywność. Rozpatrując olejki eteryczne, warto wspomnieć o badaniach przeprowadzonych na oleju otrzymanym z *Satureja thymbra* L. [29]. Ujawniono, że ta złożona mieszanina terpenów wykazuje zdolność hamowania działania zarówno AChE, jak też BuChE, dla których IC_{50} wynoszą odpowiednio 150 µg/ml i 166 µg/ml. Spośród składników otrzymanego olejku najwyższą aktywność wykazały karwakrol i γ -terpinen. Podobne badania zostały przeprowadzone dla olejku otrzymanego z *Stachys lavandulifolia* Vahl (*Lamiaceae*) [30]. W tym przypadku ujawniono wysoką aktywność diterpenu stachysolonu, dla którego IC_{50} w stosunku do BuChE wyniósł 0,06 mg/ml. Badania w kierunku inhibicji AChE ujawniły najwyższą aktywność β -mircenu, β -pinenu, kariofilenu i germakrenu. Oprócz wspomnianych wyżej roślin, wysoką aktywność inhibicyjną wykazują olejki eteryczne z następujących gatunków: *Pimpinella anisoides* V. Brig., *Rosmarinus officinalis* L., *Blattella germanica* oraz wiele innych m.in. z rodzaju *Pinus*, *Salvia* oraz *Phlomis* [31, 32, 33, 34].

Oprócz badań prowadzonych na złożonych mieszaninach terpenów jakimi są olejki eteryczne, analiza składu i następnie badania składników ujawniły, które substancje odpowiedzialne są za ich wysoką aktywność. Zgodnie z badaniami przedstawionymi przez Kaufmann i wsp. aktywność anty-AChE wykazują następujące terpeny: borneol, kamfen, kamfor, karwakrol, karwon, 1,8-cyneol, cytral, cytronelal, β -citronelol, geraniol, limonen, linalol, menton, β -mircen, myrtenal, nerol, α - i β -pinen, terpinen-4-ol, tymol i werbenon [35]. Ponadto wykazano, że cztery spośród wymienionych substancji, tj. karwakrol, 1,8-cyneol, myrtenal i werbenon wykazały aktywność porównywalną z wykorzystywanymi inhibitorami, takimi jak galantamina i fizostygmina. Ciekawe badania zostały także przedstawione przez López i Pascual-Villalobos [36]. W tym przypadku wykorzystano osiem terpenów: linalol, kamfor, γ -terpinen, geraniol, karwon, anetol, fenchon i estragol. Badania przeprowadzone z zastosowaniem metody Ellmana ujawniły, iż wszystkie analizowane związki wykazują odwracalną inhibicję AChE. Najskuteczniejszymi inhibitorami okazały się linalol i karwon, natomiast najsłabszym geraniol. Zadowalającą aktywność inhibicyjną terpenów wykazano także w pracy badawczej przedstawionej przez Woj-

tunik-Kuleszę i wsp. [37]. W tym przypadku wykorzystano zarówno badania *in vitro* i *in silico*. Otrzymane wyniki badań wykazały aktywność większości związków z wybranej grupy 18 terpenów. Szczegółowa analiza badań *in vitro* (metody Marstona i Ellmana) pokazała zadowalającą aktywność m.in. karwonu, linalolu, β -mircenu, cytronelalu, α -felandrenu oraz pulegonu. W przypadku badań z wykorzystaniem modelowania molekularnego wykazano, że wszystkie substancje zostały zadokowane w miejscu aktywnym enzymu AChE. Warto wspomnieć o karwonie, pulegonie i γ -terpinenie, które po szczegółowej analizie wszystkich otrzymanych wyników badań można przedstawić jako potencjalne inhibitory AChE.

Inhibicja α -amylazy i α -glukozydazy

Jedną z najczęściej występujących chorób w naszym społeczeństwie jest cukrzyca. Pomimo wieloletnich badań i rosnącej liczby chorych, schorzenie to nadal stanowi wyzwanie dla współczesnej nauki. Jak wspomniano wcześniej, cukrzyca jest chorobą metaboliczną wynikającą z zaburzenia przemiany węglowodanów. Wysoki poziom cukru we krwi może być kontrolowany poprzez dobór odpowiedniej diety, lecz w większości przypadków niezbędne jest leczenie farmakologiczne. Jednym z rozwiązań w walce z zaburzonym metabolizmem cukrów jest opóźnienie absorpcji glukozy. Możemy osiągnąć to poprzez inhibicję α -amylazy i/lub α -glukozydazy, enzymów odpowiedzialnych za rozkład cukrów złożonych do ich najprostszej postaci [38, 39]. Zgodnie z dostępną literaturą, odwracalna inhibicja wspomnianych enzymów prowadzi do pożądanego obniżenia poziomu glukozy we krwi. Obecnie dostępne substancje aktywne negatywnie wpływają na układ pokarmowy, dlatego też celem badań jest znalezienie inhibitorów wspomnianych enzymów, których przyjmowanie nie będzie wiązało się ze skutkami ubocznymi [40].

Jedną z grup substancji naturalnych analizowanych w kierunku inhibicji α -amylazy i α -glukozydazy są terpeny. Spośród dostępnych badań warto wspomnieć o analizie olejku eterycznego otrzymanego z *Sideritis galatica*, którego głównymi składnikami są α -pinen (23%), β -pinen (32.2%), β -ocymen (9.5%), β -kariofilen (16.9%), germakren (1.2%) i tlenek kariofilenu (1.2%) [41]. Wyniki badań ujawniły jego zadowalającą aktywność zarówno w stosunku do α -amylazy (IC_{50} = 0,899 mg/ml) i α -glukozydazy (IC_{50} = 0,632 mg/ml), dla których wartości IC_{50} wykazały wartość podobną do akorbozy, inhibitora występującego w obecnie stosowanych lekach dla diabetyków. Podobne badania zostały przeprowadzone dla olejku eterycznego otrzymanego z *Harita cheirifolia*

L., którego głównymi składnikami są α -pinen, kamfen, sabinen, *p*-cymen, mircen, α - i γ -terpinen, terpinolen, werbenol, werbenon i limonen [42]. W tym przypadku badacze wykazali aktywność inhibicyjną w stosunku do α -glukozydazy (IC_{50} 0,24 mg/ml). Oprócz badań prowadzonych na złożonych mieszaninach terpenów, znaczna część analiz opiera się na pojedynczych substancjach, takich jak geraniol, nerol, cytral, linalol, limonen, alkohol perylowy, citronelol, mentol, terpineny i terpinolen [43]. Substancje zostały przebadane w kierunku zarówno α -amylazy i α -glukozydazy. Wyniki pokazały wysoką aktywność inhibicyjną cytralu w stosunku do α -amylazy (45,7% przy stężeniu 10 mM). W przypadku α -glukozydazy najwyższą aktywność ujawniły limonen i alkohol perylowy, dla których osiągnięto aktywność na poziomie odpowiednio 21,3% i 21,1%. Dostępna jest duża grupa nowych terpenów wyizolowanych z różnych gatunków roślin, dla których została określona struktura chemiczna. Należy zwrócić uwagę na substancje zaproponowane przez Wang i wsp. [44], Malmir i wsp. [45], Jabeen i wsp. [46] oraz Ogawa i wsp. [47], którzy przedstawiają nowe terpeny jako potencjalne inhibitory wspomnianych enzymów.

WNIOSKI

Naturalne terpeny stanowią bogatą grupę substancji o wielokierunkowej aktywności biologicznej. Należy zauważyć, że zarówno pojedyncze substancje, jak też olejki eteryczne są ustawicznie badane przez naukowców na całym świecie. Zgodnie z tym, co przed-

stawiono powyżej, substancje te wykazują zadowalającą aktywność zarówno w kierunku zmiatania wolnych rodników oraz hamowania enzymów AChE i BuChE, jak też inhibicji α -amylazy i α -glukozydazy. Mogą być zatem rozpatrywane jako substancje o potencjalnym zastosowaniu w leczeniu choroby Alzheimera i cukrzycy.

W związku z powyższym, terpeny wykazują wysoką zdolność zmiatania wolnych rodników. Zarówno olejki eteryczne, jak też ich składniki wykazują zdolność przeciwdziałania jednej z przyczyn AD, czyli stresowi oksydacyjnemu. Najwyższą aktywnością wyróżniają się m.in. pulegon, karwon, γ -terpinen, farnezen, ocymen oraz cytral. Oprócz właściwości antyoksydacyjnych, pożądaną aktywnością terpenów jest ich zdolność do inhibicji AChE. Przedstawione badania pokazują grupę terpenów jako źródło potencjalnych inhibitorów wspomnianego enzymu. Warto wspomnieć tutaj o karwonie, pulegonie, γ -terpinenie, karwakrolu oraz innych monoterpenach, których niskocząsteczkowy charakter pozytywnie wpływa na ich przenikanie przez skórę i błony plazmatyczne. Podobnie wysoką aktywność inhibicyjną terpeny wykazują w stosunku do α -amylazy i α -glukozydazy. Zadowalająca aktywność substancji, takich jak cytral czy limonen sprawia, że mogą być rozpatrywane jako substancje o potencjalnym zastosowaniu.

Podziękowania Wyrazy podziękowania dla dr Łukasza Cieśli za wsparcie merytoryczne podczas prowadzenia badań.

PIŚMIENNICTWO

1. Bartoszewska M.: Molecular mechanisms of Alzheimer's disease, *Post Biol Komórki*, 2008; 35(3): 333–50.
2. Zheng C., Zhou X.W., Wang J.Z.: The dual roles of cytokines in Alzheimer's disease: update on interleukins, TNF- α , TGF- β and IFN- γ , *Transl Neurodegener*, 2016; 5(7): 1–15.
3. Kumar A., Singh A., Ekavali.: A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update, *Pharmacol Rep*, 2015; 67(2): 195–203.
4. Singh M., Kaur M., Kukreja H., Chugh R., Silkari O., Singh D.: Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection, *Eur J Med Chem*, 2013; 70: 165–88.
5. Mehta M., Adem A., Sabbagh M.: New acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, *Int J Alzheimers Dis*, 2012; 2012: 728983.
6. Anand R., Gill K.D., Mahdi A.A.: Therapeutics of Alzheimer's disease: past, present and future, *Neuropharmacol*, 2014; 76: 27–50.
7. Ríos J.L., Francini F., Schinella G.R.: Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus, *Planta Med*, 2015; 81(12–13): 975–94.
8. Bastaki S.: Diabetes mellitus and its treatment, *Int J Diabetes & Metabolism*, 2005; 13: 111–34.
9. Rege A.A., Chowdhary A.S.: Evaluation of alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitory activities of *Ocimum sanctum* Linn, *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2014; 25(1): 130–33.
10. Schwab W., Fuchs C., Huang F.C.: Transformation of terpenes into fine chemicals, *Eur J Lipid Sci Technol*, 2013; 115: 3–8.
11. Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N., Mnif W.: Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review, *Medicines*, 2016; 3(4): 1–16.
12. Yadav N., Yadav R., Goyal A.: Chemistry of terpenoids, *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2014; 27(2): 272–78.

13. Adaszyńska M., Swarczewicz M.: Olejki eteryczne jako substancje aktywne lub konserwanty w kosmetyce, *Wiadomości Chemiczne*, 2012; 66(1–2): 139–58.
14. Raman A., Weir U., Bloomfield S.F.: Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on *Staphylococcus aureus*, *Staph. epidermidis* and *Propionibacterium acnes*, *Letters in Appl Microbiol*, 1995; 21(4): 242–45.
15. Mahboubi M.: *Mentha spicata* as natural analgesia for treatment of pain in osteoarthritis patients, *Complement Ther Clin Pract*, 2017; 26: 1–4.
16. Aqil M., Ahad A., Sultana Y., Ali A.: Status of terpenes as skin penetration enhance, *Drug Discov Today*, 2007; 12(23–24): 1061–67.
17. Porres-Martínez M., González-Burgos E., Carretero M.E., Gómez-Serranillos M.P.: Major selected monoterpenes α -pinene and 1,8-cineole found in *Salvia lavandulifolia* (Spanish sage) essential oil as regulators of cellular redox balance, *Pharm Biol*, 2015; 53(6): 921–29.
18. Kunwar A., Priyadarsini K.I.: Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health, *J Med Allied Sci*, 2011; 1(2): 53–60.
19. Madeo J., Elsayad C.: The role of oxidative stress in Alzheimer's disease, *J Alzheimers Dis Parkinsonism*, 2013; 3: 1–5.
20. Markesbery W.R.: The role of oxidative stress in Alzheimer disease, *Arch Neurol*, 1999; 56(12): 1449–52.
21. Cieśla L.M., Wojtunik-Kulesza K.A., Oniszczuk A., Waksmundzka-Hajnos M.: Antioxidant synergism and antagonism between selected monoterpenes using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method, *Flavour Fragr J*, 2016; 31: 412–19.
22. Snoussi M., Noumi E., Trabelsi N., Flamini G., Papetti A., De Feo V.: *Mentha spicata* essential oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of *Vibrio spp.* *Strain, Molecules*, 2015; 20(8): 14402–24.
23. Popova A., Daleska Z., Mihaylova D., Hristova I., Alexieva I.: *Melissa officinalis* L.- GC profile and antioxidant activity, *IJPPR*, 2016; 8(4): 634–38.
24. Wojtunik K.A., Cieśla L.M., Waksmundzka-Hajnos M.: Model studies on the antioxidant activity of common terpenoid constituents of essential oils by means of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method, *J Agric Food Chem*, 2014; 62(37): 9088–94.
25. Duarte A., Luís A., Oleastro M., Domingues F.C.: Antioxidant properties of coriander essential oil and linalool and their potential to control *Campylobacter spp.*, *Food Control*, 2016; 61: 115–22.
26. Turkez H., Sozio P., Geyikoglu F., Tatar A., Hacimuftuoglu A., Di Stefano A.: Neuroprotective effects of farnesene against hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in vitro, *Cell Mol Neurobiol*, 2014; 34(1): 101–11.
27. Sugimoto H., Yamanishi Y., Iimura Y., Kawakami Y.: Donepezil hydrochloride (E2020) and other acetylcholinesterase inhibitors, *Curr Med Chem*, 2000; 7(3): 303–39.
28. Anand R., Gill K.D., Mahdi A.A.: Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future, *Neuropharmacology*, 2014; 76: 27–50.
29. Öztürk M.: Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil, *Food Chem*, 2012; 134(1): 48–54.
30. Tundis R., Bonesi M., Pugliese A., Nadjafi F., Menichini F., Loizzo M.R.: Tyrosinase, acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl (Lamiaceae) and its major constituents, *Rec Nat Prod*, 2015; 9(1): 81–93.
31. Mills C., Cleary B.J., Gilmer B.F., Walsh J.J.: Inhibition of acetylcholinesterase by tea tree oil, *JPP*, 2004; 56(3): 375–79.
32. Orhan I., Aslan S., Kartal M., Şener B., Hüsni Can Başer K.: Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes, *Food Chem* 2008; 108(2): 663–68.
33. Temel H.E., Demirci B., Demirci F., Celep F., Kahraman A., Doğan M., Başer K.H.C.: Chemical characterization and anticholinesterase effects of essential oils derived from *Salvia* species, *J Essent Oil Res*, 2016; 28(4): 322–31.
34. Sarikurkcü C., Uren M.C., Kocak M.S., Cengiz M., Tepe B.: Chemical composition, antioxidant, and enzyme inhibitory activities of the essential oils of three phlomis species as well as their fatty acid compositions, *Food Sci Biotechnol*, 2016; 25(3): 687–93.
35. Kaufmann D., Dogra A.K., Wink M.: Myrtenal inhibits acetylcholinesterase, a known Alzheimer target, *JPP*, 2011; 63(10): 1368–71.
36. López M.D., Pascual-Villalobos M.J.: Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control, *Ind Crop Prod*, 2010; 31: 284–88.
37. Wojtunik-Kulesza K.A., Targowska-Duda K., Klimek K., Ginalska G., Jóźwiak K., Waksmundzka-Hajnos M., Cieśla L.: Volatile terpenoids as potential drug leads in Alzheimer's disease. *Open Chem*, 2017; 15: 332–43.
38. Subramanian R., Asmawi M.Z., Sadikun A.: In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide, *Acta Biochim Pol*, 2008; 55(2): 391–98.
39. Nair S.S., Kavrekar V., Mishra A.: In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts, *Eur J Exp Biol*, 2013; 3(1): 128–32.
40. Yina Z., Zhanga W., Fenga F., Zhanga Y., Kanga W.: α -Glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants, *Food Science and Human Wellness*, 2014; 3(3–4): 136–74.
41. Zengin G., Sarikürkçü C., Aktümsek A., Ceylan R.: Antioxidant potential and inhibition of key enzymes linked to Alzheimer's diseases and diabetes mellitus by monoterpenes-rich essential oil from *Sideritis galatica* Bornm. Endemic to Turkey, *Rec Nat Prod*, 2016; 10(2): 195–206.
42. Majouli K., Hlila M.B., Hamdi A., Flamini G., Jannet H.B., Kenani A.: Antioxidant activity and α -glucosidase inhibition by essential oils from *Hertia cheirifolia* (L.), *Ind. Crops Prod*, 2016; 82: 23–8.

43. Tan X.C., Chua K.H., Ravishankar Ram M., Kuppusamy U.R.: Monoterpenes: novel insights into their biological effects and roles on glucose uptake and lipid metabolism in 3T3-L1 adipocytes, *Food Chem*, 2016; 196: 242–50.
44. Wang Z.W., Wang J.S., Luo J., Kong L.Y.: α -Glucosidase inhibitory triterpenoids from the stem barks of *Uncaria laevigata*, *Fitoterapia*, 2013; 90: 30–7.
45. Malmir M., Gohari A.R., Saeidnia S., Silva O.: A new bio-active monoterpene-flavonoid from *Satureja khuzistanica*, *Fitoterapia*, 2015; 105: 107–12.
46. Jabeen B., Riaz N., Saleem M., Naveed M.A., Ashraf M., Alam U., Rafiq H.M., Tareen R.B., Jabbar A.: Isolation of natural compounds from *Phlomis stewartii* showing α -glucosidase inhibitory activity, *Phytochem*, 2013; 96: 443–48.
47. Ogawa S., Hosoi K., Ikeda N., Makino M., Fujimoto Y., Iida T.: Oxyfunctionalization products of terpenoids with dimethyldioxirane and their biological activity, *Chem Pharm Bull*, 2007; 55(2): 247–50.

Stężenie irisiny a zaburzenia czynności tarczycy – nowości w endokrynologii

Irisin and thyroid dysfunction – news in endocrinology

*Ariadna Zybek-Kocik,
Marek Ruchała*

Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Źródło finansowania: Badania prowadzone w ramach rozprawy doktorskiej będącej podstawą poniższej publikacji były finansowane ze środków statutowych Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz stypendium Narodowej Fundacji Polpharmy.

Streszczenie

Irisina, zwana też iryzyną, to nowo odkryta adipomiokina wydzielana pod wpływem aktywności fizycznej, mająca znaczący wpływ na metabolizm organizmu. Pod jej wpływem dochodzi do tzw. „brązowienia” białej tkanki tłuszczowej oraz zwiększenia termogenezy. W ostatnim czasie opisano zmiany stężenia irisiny w zaburzeniach czynności tarczycy.

Celem pracy jest przedstawienie założeń rozprawy doktorskiej autorki opisującej zmiany stężenia irisiny w różnych stanach funkcjonalnych tarczycy, składającej się z trzech publikacji powiązanych tematycznie, omówienie uzyskanych wyników oraz ich przedyskutowanie w kontekście najnowszych doniesień w tej dziedzinie.

Dotychczas opublikowane dane na temat związku zaburzeń czynności tarczycy oraz stężenia irisiny wskazują na znaczący wpływ jawnej nadczynności i niedoczynności tarczycy na stężenie irisiny. Opisane zmiany zachodzą prawdopodobnie wskutek znaczącego wpływu zaburzeń czynności tarczycy na metabolizm tkanki mięśniowej. Co więcej, dają one nadzieję na wykorzystanie tych zjawisk w praktyce klinicznej, celem zapewnienia bardziej optymalnej opieki nad pacjentami dotkniętymi zaburzeniami czynności tarczycy.

Jednakże dostępne dane nie są w pełni zgodne oraz wciąż brakuje dużych, randomizowanych, prospektywnych badań, mogących w pełni wyjaśnić dotychczas opisane zjawiska. Wymagają one dalszej analizy oraz dogłębnej oceny stojących za nimi patomechanizmów, celem wdrożenia ich do praktyki klinicznej.

Słowa kluczowe: irisina, niedoczynność tarczycy, nadczynność tarczycy, tkanka mięśniowa

Wpłynęło: 10-01-2019

Zaakceptowano: ??-??-????

Opublikowano: ??-??-????

Adres do korespondencji

Ariadna Zybek-Kocik
Klinika Endokrynologii, Przemiany
Materii i Chorób Wewnętrznych,
Uniwersytet Medyczny im. Karola
Marcinkowskiego w Poznaniu,
ul. Przybyszewskiego 49,
60-355 Poznań;
e-mail: ariadna.zybek@gmail.com

Abstract:

Irisina, zwana też iryzyną, to nowo odkryta adipomiokina wydzielana pod wpływem aktywności fizycznej, mająca znaczący wpływ na metabolizm organizmu. Pod jej wpływem dochodzi do tzw. „brązowienia” białej tkanki tłuszczowej oraz zwiększenia termogenezy. W ostatnim czasie opisano zmiany stężenia irisiny w zaburzeniach czynności tarczycy.

Celem pracy jest przedstawienie założeń rozprawy doktorskiej autorki opisującej zmiany stężenia irisiny w różnych stanach funkcjonalnych tarczycy, składającej się z trzech publikacji powiązanych tematycznie, omówienie uzyskanych wyników oraz ich przedyskutowanie w kontekście najnowszych doniesień w tej dziedzinie.

Dotychczas opublikowane dane na temat związku zaburzeń czynności tarczycy oraz stężenia irisiny wskazują na znaczący wpływ jawnej nadczynności i niedoczynności tarczycy na stężenie irisiny. Opisane zmiany zachodzą prawdopodobnie wskutek znaczącego wpływu zaburzeń czynności tarczycy na metabolizm tkanki mięśniowej. Co więcej, dają ona nadzieję na wykorzystanie tych zjawisk w praktyce klinicznej, celem zapewnienia bardziej optymalnej opieki nad pacjentami dotkniętymi zaburzeniami czynności tarczycy.

Jednakże dostępne dane nie są w pełni zgodne oraz wciąż brakuje dużych, randomizowanych, prospektywnych badań mogących w pełni wyjaśnić dotychczas opisane zjawiska. Wymagają one dalszej analizy oraz dogłębnej oceny stojących za nimi patomechanizmów, celem wdrożenia ich do praktyki klinicznej.

Słowa kluczowe: irisina, niedoczynność tarczycy, nadczynność tarczycy, tkanka mięśniowa

WPROWADZENIE

W związku z dużym zagrożeniem dla zdrowia światowej populacji, jakim jest pojawienie się epidemii otyłości, w ostatnich latach zintensyfikowano badania nad hormonalnymi podłożami ludzkiego metabolizmu. W szczególności dotyczy to czynności hormonalnej tkanki mięśniowej oraz tkanki tłuszczowej, będących ważnym źródłem wydatkowania i magazynowania energii w organizmie. Irisina, nazywana również w polskiej literaturze iryzyną, jest nowo odkrytym peptydem wydzielanym w głównej mierze przez tkankę mięśniową, a także w niewielkich ilościach przez tkankę tłuszczową. Ta adipomiokina została opisana po raz pierwszy w 2012 roku przez badaczy z Uniwersytetu Harvarda [1]. Jest fragmentem domeny zewnątrzkomórkowej białka FNDC5, kodowanego u ludzi przez gen *FNDC5*, umiejscowiony na chromosomie 1 w pozycji 35.1. Zgodnie z dotychczas opublikowanymi badaniami irisina jest wydzielana do krążenia pod wpływem zwiększonej aktywności fizycznej oraz stymulacji PGC-1 α – jednej z najistotniejszych cząsteczek wpływających na metabolizm energetyczny

organizmu [1, 2, 3]. Pod wpływem wydzielania irisiny dochodzi w obrębie tkanki tłuszczowej do nasilenia procesów związanych z termogenezą, a tym samym zwiększonym wydatkowaniem energii. Proces ten nazywamy „brązowieniem” białej tkanki tłuszczowej, czyli procesem konwersji białych adipocytów w beżową tkankę tłuszczową, znacznie bardziej aktywną metabolicznie przypominającą budową i funkcją tkankę tłuszczową brunatną [3, 4, 5]. Dotąd jednak, pomimo intensywnych badań, nie zidentyfikowano receptora dla irisiny. Dzięki opisanym właściwościom dopatruje się roli irisiny w pozytywnym wpływie aktywności fizycznej na zdrowie. Równie istotny wpływ za metabolizm organizmu mają również hormony tarczycy. Tyroksyna oraz biologicznie aktywna trójiodotyrosyna nasilają termogenezę oraz kontrolują równowagę energetyczną organizmu poprzez liczne szlaki metaboliczne, również poprzez wpływ na brązową tkankę tłuszczową [6, 7]. Z tego względu w ostatnich latach pojawiły się doniesienia na temat wzajemnego wpływu zaburzeń czynności tarczycy oraz zmian stężenia irisiny w surowicy. Zmiany stężenia irisiny oraz ekspresji tkankowej genu *FNDC5*

były także przedmiotem rozprawy doktorskiej dr n. med. Ariadny Zybek-Kocik, stypendystki Naukowej Fundacji Polpharmy. Obecna publikacja ma na celu przedstawienie założeń rozprawy doktorskiej składającej się z trzech publikacji powiązanych tematycznie, omówienie uzyskanych wyników oraz ich przedyskutowanie w kontekście najnowszych doniesień w tej dziedzinie.

BADANIA

W chwili obecnej dostępnych jest stosunkowo niewiele danych, zarówno na modelach zwierzęcych jak i na pacjentach, mających ocenić wzajemny wpływ zaburzeń czynności tarczycy oraz stężenia irisiny w surowicy. Pierwsze badanie oceniające zmiany stężenia irisiny u pacjentów dotkniętych zaburzeniami czynności tarczycy zostało opublikowane w roku 2014 [8]. Udowodniono, że jawne zaburzenia czynności tarczycy mają istotny wpływ na stężenie irisiny, a pacjenci z niedoczynnością tarczycy mają niższe stężenie irisiny w porównaniu do pacjentów dotkniętych nadczynnością gruczołu, jednakże na granicy istotności statystycznej. Co więcej, wykazano ujemną korelację pomiędzy poziomami irisiny i tyreotropiny (TSH), a także dodatnią korelację między poziomami irisiny i wolnej tyroksyny (fT4). Celem oceny zaburzeń tkanki mięśniowej oceniono także poziom szeroko opisanego oraz używanego w praktyce klinicznej markera destrukcji mięśniowej – kinazy kreatynowej (CK). Poziom CK był ujemnie skorelowany zarówno ze stężeniami irisiny, jak i fT4 i wolnej trój-jodotyroniny (fT3). Dało to podstawę przypuszczać, że uwidocznione zmiany stężenia irisiny mogą być skutkiem uszkodzenia włókien mięśniowych, opisywanego wcześniej w odniesieniu do zaburzeń czynności tarczycy. Praca opublikowana w czasopiśmie *Peptides* [8] była pierwszą pracą wchodzącą w skład cyklu publikacji.

Na podstawie doświadczeń z poprzedniego badania, ten sam zespół opublikował w roku 2016 badanie opisujące wpływ długości trwania zaburzeń czynności tarczycy na stężenie irisiny [9]. W badaniu wzięło udział 36 osób – dwie grupy po 12 pacjentów z długotrwałą i krótkotrwałą jawną niedoczynnością tarczycy oraz grupa kontrolna składająca się z 12 zdrowych osób. Pacjenci z nowo zdiagnozowaną autoimmunologiczną chorobą tarczycy stanowili grupę z przypuszczalnym długotrwałym zaburzeniem czynności tarczycy, natomiast grupę z krótkotrwałą niedoczynnością stanowili pacjenci po całkowitej tyreoidotomii z powodu zróżnicowanego raka tarczycy, którzy nie pobierali preparatu L-tyroksyny cztery tygodnie przed leczeniem radiojodem. W badaniu

stwierdzono istotnie niższe stężenie irisiny w grupie pacjentów z długotrwałą niedoczynnością tarczycy w porównaniu ze stężeniem u pacjentów z niedoczynnością krótkotrwałą i w grupie kontrolnej, bez istotnej statystycznie różnicy między niedoczynnością krótkotrwałą i w grupie kontrolnej. Co ważne, nie uwidoczniono istotnej różnicy między stężeniami fT3 i fT4 u pacjentów z obu grup dotkniętych niedoczynnością tarczycy. Stężenie CK było znacząco wyższe w grupie z niedoczynnością długotrwałą niż u pacjentów z grupy kontrolnej, bez istotnej różnicy między pacjentami z grup z niedoczynnością tarczycy oraz pacjentami z krótkotrwałą niedoczynnością i grupy kontrolnej. Poziom CK ponownie korelował negatywnie z poziomem irisiny [9].

Ostatnią pracą opublikowaną w ramach cyklu była praca z 2018 roku [10]. Była to pierwsza praca, zgodnie z wiedzą Autorów, oceniająca prospektywnie wpływ zaburzeń czynności tarczycy na stężenie irisiny na dużej grupie badanej. Łącznie badaniem objęto 119 pacjentów ze świeżo rozpoznaną ciężką nadczynnością tarczycy lub niedoczynnością tarczycy – odpowiednio 55 i 64 osób, oraz grupę kontrolną 45 zdrowych osób. Pacjentów z niedoczynnością tarczycy ponownie podzielono, według schematu użytego w poprzednim badaniu, na dwie podgrupy: z domniemaną długotrwałą niedoczynnością spowodowaną autoimmunologiczną chorobą tarczycy oraz z przypuszczalną krótkotrwałą niedoczynnością tarczycy, u pacjentów w trakcie leczenia zróżnicowanego raka tarczycy, po czasowym odstawieniu leczenia L-tyroksyną przed leczeniem radiojodem. Stężenie TSH, fT4, fT3 i CK nie różniły się istotnie pomiędzy grupami dotkniętymi niedoczynnością tarczycy, bez względu na czas trwania zaburzenia. Stężenie irisiny, podobnie jak w badaniach poprzednich, było istotnie niższe u pacjentów z długotrwałą niedoczynnością tarczycy niż u pacjentów z nadczynnością, krótkotrwałą niedoczynnością i osób z grupy kontrolnej. Co więcej, w ostatnim badaniu oceniono również stężenie w surowicy dużych białek sarkomeru – titiny i dystrofiny. Miało to na celu ocenę ich przydatności jako markerów głębokich zaburzeń metabolizmu tkanki mięśniowej. Zaobserwowano, że stężenia dystrofiny i titiny istotnie różniły się pomiędzy badanymi grupami, z tendencją do niższych stężeń dystrofiny w grupie z długotrwałą niedoczynnością w porównaniu z grupą kontrolną oraz niższych stężeń titiny w grupie z długotrwałą niedoczynnością oraz nadczynnością tarczycy. Co więcej, pacjenci z nadczynnością tarczycy mieli wyższe stężenia glukozy niż osoby z grupy kontrolnej. Następnie u wszystkich pacjentów zastosowano odpowiednie leczenie choroby podstawowej, mające na

celu uzyskanie wyrównania hormonalnego. Średni czas obserwacji wynosił 10,5 miesiąca dla grupy pacjentów z niedoczynnością tarczycy i 7 miesięcy dla grupy z nadczynnością. Warto podkreślić, że przewlekłe autoimmunologiczne zapalenie tarczycy jest chorobą rozwijającą się powoli, prowadzącą do niedoczynności tarczycy, a w momencie rozpoczęcia leczenia pacjenci jeszcze do czasu uzyskania eutyreozy nie otrzymali pełnego wyrównania hormonalnego przez wiele miesięcy. W tym czasie ich tkanka mięśniową pozostawała pod wpływem niedoczynności tarczycy o różnym nasileniu. Tak więc, u pacjentów z długotrwałą niedoczynnością tarczycy, po osiągnięciu wyrównania hormonalnego, uwidoczniono zmniejszoną masę ciała, *Body Mass Index* (BMI), masę beztłuszczową, masę mięśniową oraz stężenia CK, jak również wzrost stężenia irisiny, do wartości obserwowanych w grupie kontrolnej. Spadek masy mięśniowej i masy ciała u tych pacjentów prawdopodobnie wynika z długotrwałego wpływu niedoczynności tarczycy na tkankę mięśniową w czasie pomiędzy rozpoczęciem leczenia a uzyskaniem wyrównania hormonalnego. Z kolei w grupie pacjentów z nadczynnością tarczycy wraz z normalizacją stężeń TSH, fT3 i fT4 zaobserwowano wzrost masy ciała, BMI, masy tkanki tłuszczowej, odsetka tkanki tłuszczowej i poziomu CK, a także spadek stężenia glukozy. Nie zaobserwowano w tej grupie pacjentów zmian stężenia irisiny. Podobnie jak w badaniach poprzednich stwierdzono pozytywną korelację pomiędzy stężeniem irisiny a stężeniem fT4 i fT3, natomiast CK korelowało ujemnie ze stężeniem irisiny. Nie uwidoczniło korelacji irisiny ze stężeniami dystrofiny i titiny. Nie stwierdzono również związku między stężeniami irisiny a mianami przeciwciał przeciwko peroksydazie tarczycowej (aTPO) i przeciwciał przeciwko receptorowi TSH (TRAb). Uwidoczniło jedynie korelację stężenia irisiny z mianem przeciwciał przeciwko tyreoglobulinie (aTg), jednakże była ona na granicy istotności statystycznej. Uzyskane wyniki wskazują, że prawdopodobnie obserwowane zmiany stężenia irisiny nie są związane z autoimmunologicznym podłożem opisywanych zaburzeń. Prawdopodobną przyczyną jest natomiast plejotropowy wpływ ciężkich zaburzeń czynności tarczycy na tkankę mięśniową. Ważną przesłanką ku temu jest dynamika zmian stężenia CK, będącego uznanym a praktyce klinicznej markerem destrukcji mięśniowej, a także zmiany stężenia dużych białek sarkomeru – titiny i dystrofiny, które także mogą sugerować nasilenie katabolizmu bądź zaburzenie syntezy białek mięśniowych. Stężenie tych białek w surowicy zostało ocenione w ciężkich zaburzeniach czynności tarczycy po raz pierwszy, celem oceny ich przydatności klinicznej w tej grupie pacjentów. Dodatkowo,

przeanalizowano ekspresję genu *FNDC5* w próbkach tkanki tarczycy pobranych od 80 pacjentów, z rozpoznaniem wola guzkowego nietoksycznego, wola toksycznego, choroby Gravesa-Basedowa i raka brodawkowego tarczycy, poddanych tyreoidektomii z powodów niezwiązanych z badaniem. Stwierdzono ekspresję genu *FNDC5* we wszystkich analizowanych próbkach. Stwierdzono nieznaczna nadekspresję genu *FNDC5* w tkance tarczycy u pacjentów z wolem guzkowym toksycznym w porównaniu z tkankami u pacjentów dotkniętych chorobą Gravesa-Basedowa, rakiem brodawkowym tarczycy (pT1/pT2) i próbkami kontrolnymi, na granicy istotności statystycznej. Podsumowując, pacjenci z długotrwałą niedoczynnością tarczycy mają niższe stężenie irisiny niż pacjenci z niedoczynnością krótkotrwałą, nadczynnością tarczycy oraz osoby z grupy kontrolnej. Natomiast obserwowane zmiany stężenia irisiny w surowicy u pacjentów z długotrwałą niedoczynnością tarczycy ulegają normalizacji wraz z uzyskaniem wyrównania hormonalnego i są prawdopodobnie wynikiem przede wszystkim przedłużonej miopatii. Zgodnie z uzyskanymi wynikami badania genetycznego można przypuszczać, że zmiany stężenia irisiny najprawdopodobniej nie są związane z ekspresją genu *FNDC5* w tkance tarczycy. Co więcej, ekspresja genu *FNDC5* najpewniej nie jest także związana z rozwojem zmian złośliwych w obrębie gruczołu tarczowego [10].

Podobną grupę badaną, złożoną z pacjentów u których zaprzestano leczenia L-tyroksyną 4 tygodnie przed planowanym leczeniem radiojodem z powodu zróżnicowanego raka tarczycy, uzyskując porównywalne wyniki opisali Panagiotou i wsp [11]. Oba badania potwierdzają, że krótkotrwałe zaburzenia czynności tarczycy, nawet bardzo ciężkie, nie wpływają istotnie na stężenie irisiny. Nie stwierdzono także wpływu subklinicznej niedoczynności tarczycy na stężenie irisiny [11]. Podobne wyniki, jeżeli chodzi o stężenie irisiny u pacjentów leczonych z powodu długotrwałej niedoczynności tarczycy, uzyskali Uc i wsp. [12]. W tym badaniu stężenie irisiny u pacjentów z niedoczynnością tarczycy spowodowaną autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy było znacznie niższe niż w grupie kontrolnej, co więcej uległo normalizacji po uzyskaniu wyrównania hormonalnego. Uzyskano także podobne obserwacje dotyczące stężenia CK u tych pacjentów. Należy jednak zauważyć, że badanie było przeprowadzone na stosunkowo niewielkiej grupie badanych (26 pacjentów z niedoczynnością tarczycy oraz 19 zdrowych osób w grupie kontrolnej).

Niemniej jednak Ateş i wsp. [13] w swoim badaniu opisali, że stężenie irisiny ulega zwiększeniu u pa-

pacjentów z niedoczynnością tarczycy, oraz że otyłość jest niezależnym czynnikiem ryzyka niedoczynności tarczycy. Jednakże, należy zauważyć, że większość pacjentów w grupie badanej była dotknięta subkliniczną niedoczynnością tarczycy ze średnim stężeniem TSH 13.1 $\mu\text{IU/mL}$, a większość pacjentów miała nadwagę bądź była otyła, co mogło w istotny sposób wpłynąć na uzyskane wyniki. Pacjenci otyli mają bowiem znacząco wyższe stężenie irisiny niż osoby szczupłe. [14, 15]. W badaniu opisano także pozytywną korelację irisiny z wagą ciała, BMI, masą tkanki tłuszczowej, masą komórkową ciała oraz beztłuszczową masą ciała [13]. Ponownie większe stężenie irisiny u pacjentów z subkliniczną niedoczynnością tarczycy opisali także Stratigou i wsp. [16]. Średnie stężenie TSH w grupie badanej wynosiło 8.6 13.1 $\mu\text{IU/mL}$. W tym badaniu należy jednak również zwrócić uwagę na wpływ zwiększonej ilości tkanki tłuszczowej w grupie badanej. Pacjenci z subkliniczną niedoczynnością tarczycy mieli istotnie wyższą masę ciała, masę tkanki tłuszczowej oraz BMI od grupy badanej. Obie grupy miały średnio powyżej 30% zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie. Biorąc pod uwagę, że 40% badanych stanowili mężczyźni, mogło to mieć związek z uzyskanymi wynikami. Co więcej, pacjenci z niedoczynnością tarczycy w porównaniu do grupy kontrolnej mieli również znacząco wyższe stężenie insuliny oraz glukozy, co mogło istotnie wpłynąć podane rezultaty. W czterech pozostałych dotychczas opublikowanych badaniach zwrócono także uwagę na wzrost stężenia irisiny w nadczynności tarczycy [17, 18, 19, 20]. Porównanie uzyskanych wyników jest trudne, ze względu na fakt, że pierwsze dwa badania zostały przeprowadzone na modelu zwierzęcym [18, 20] natomiast kolejne dwa opisują grupy pacjentów o znacznie mniejszym nasileniu nadczynności tarczycy (27.30(17) oraz 30 pmol/L (19)), niż w pracach opublikowanych przez zespół z Poznania (55.05 pmol/L (10)).

Należy zaznaczyć, że zarówno niedoczynność jak i nadczynność w znaczący sposób wpływają na funkcję tkanki mięśniowej. Zaburzenia czynności tarczycy wpływają w sposób złożony na włókna mięśniowe, powodując zaburzenia funkcji, jak i niekiedy struktury tkanki mięśniowej. Hormony tarczycy, działając na poziomie receptorów jądrowych, regulują ekspresję przynajmniej 607 genów w obrębie komórek mięśniowych związanych przede wszystkim z metabolizmem energetycznym [21]. W ostatnim badaniu, wchodzącym w skład cyklu publikacji, zwrócono uwagę na obniżenie stężenia w surowicy titiny i dystrofiny – dużych białek strukturalnych sarkomeru [22] – zarówno u pacjentów z nadczynnością jak i niedoczynnością tarczycy. Zmiany te sugerują

występowanie znacznych zaburzeń funkcjonalnych włókien mięśniowych u tych pacjentów. Może to sugerować, jak już wcześniej opisano, zaburzenia syntezy lub też nasilenie katabolizmu białek mięśniowych skutkujące obserwowaną klinicznie miopatią u pacjentów z zaburzeniami czynności tarczycy. Biorąc pod uwagę omówione wcześniej prace, spodziewalibyśmy się wzrostu stężenia irisiny u pacjentów z nadczynnością tarczycy [17, 18, 19, 20]. Przyczyny tego zjawiska można upatrywać właśnie w obserwowanych zmianach stężenia dużych białek strukturalnych sarkomeru, które mogą występować jedynie u pacjentów ze znacznym nasileniem nadczynności tarczycy. Być może u pacjentów dotkniętych nadczynnością tarczycy o mniejszym nasileniu opisane zmiany stężenia titiny oraz dystrofiny nie występują, a wobec mniejszego negatywnego wpływu nadczynności tarczycy na funkcję tkanki mięśniowej poziom irisiny wzrasta, jak opisano w innych badaniach. Jednakże, w badaniu wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej osoby z nadczynnością tarczycy o niewielkim nasileniu nie wchodziły w skład grupy badanej.

WNIOSKI

Wnioski z dotychczas opublikowanych prac pośrednio dostarczają dowodów na niezwykle korzystny potencjalny wpływ aktywności fizycznej na wyniki leczenia pacjentów z niedoczynnością tarczycy, poprzez poprawę masy mięśniowej oraz stężenia irisiny w surowicy, a także na możliwość przyszłego zastosowania nowych markerów dysfunkcji mięśniowej (titiny i dystrofiny – dużych białek strukturalnych komórek mięśniowych) w monitorowaniu leczenia zaburzeń czynności tarczycy.

PODSUMOWANIE

Podsumowując, doniesień na temat wzajemnego związku stężenia irisiny w surowicy oraz ekspresji genu FNDC5 w tarczycy jest w dostępnej literaturze coraz więcej. Warto zaznaczyć, że publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej dr n. med. Ariadny Zybek-Kocik oraz wynikiem wieloletniej pracy zespołu Kliniki Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu [8, 9, 10] stanowią jedno z najbardziej wartościowych doniesień w tej dziedzinie. Jednakże wciąż brakuje dużych, randomizowanych, prospektywnych badań, mogących w pełni wyjaśnić dotychczas opisane zjawiska. Wymagają one dalszej analizy oraz dogłębnej oceny stojących za nimi patomechanizmów. Pozwoli to

również w przyszłości w pełni wykorzystać uzyskane wnioski w praktyce klinicznej.

* Opisane publikacje oraz wnioski pochodzą z rozprawy na stopień doktora nauk medycznych pt. „Badanie ekspresji tkankowej oraz zmian stężenia irisy-

ny w różnych stanach funkcjonalnych tarczycy” dr. n. med. Ariadny Zybek-Kocik, Promotor: Prof. dr hab. Marek Ruchała, Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Wydział Lekarski II.

PIŚMIENNICTWO

1. Bostrom P., Wu J., Jedrychowski M.P., i wsp.: A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis, *Nature*, 2012;481(7382):463-8.
2. Pukajlo K., Kolackov K., Laczmanski L., Daroszewski J.: Irisin-a new mediator of energy homeostasis, *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2015;69:233-42.
3. Huh J.Y., Panagiotou G., Mougios V. i wsp.: FNDC5 and irisin in humans: I. Predictors of circulating concentrations in serum and plasma and II. mRNA expression and circulating concentrations in response to weight loss and exercise, *Metabolism*, 2012;61(12):1725-38.
4. Huh J.Y., Mantzoros C.S.: Irisin physiology, oxidative stress, and thyroid dysfunction: What next?, *Metabolism*, 2015;64(7):765-7.
5. Zhang Y., Li R., Meng Y., i wsp.: Irisin Stimulates Browning of White Adipocytes through Mitogen-Activated Protein Kinase p38 MAP Kinase and ERK MAP Kinase Signaling, *Diabetes*, 2014.
6. Silva J.E.: Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance, *Thyroid*, 1995;5(6):481-92.
7. Silva J.E.: Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation, *Physiol Rev*, 2006;86(2):435-64.
8. Ruchała M., Zybek A., Szczepanek-Parulska E.: Serum irisin levels and thyroid function-newly discovered association, *Peptides*, 2014;60:51-5.
9. Zybek-Kocik A., Sawicka-Gutaj N., Wrotkowska E., i wsp.: Time-dependent irisin concentration changes in patients affected by overt hypothyroidism, *Endokrynol Pol*, 2016;67(5):476-80.
10. Zybek-Kocik A., Sawicka-Gutaj N., Szczepanek-Parulska E., i wsp.: The association between irisin and muscle metabolism in different thyroid disorders, *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2018;88(3):460-7.
11. Panagiotou G., Pazaitou-Panayiotou K., Paschou S.A., i wsp.: Changes in Thyroid Hormone Levels Within the Normal and/or Subclinical Hyper- or Hypothyroid Range Do Not Affect Circulating Irisin Levels in Humans, *Thyroid*, 2016;26(8):1039-45.
12. Uc Z.A., Gorar S., Mizrak S., Gullu S.: Irisin levels increase after treatment in patients with newly diagnosed Hashimoto thyroiditis, *J Endocrinol Invest*, 2018.
13. Ates I., Altay M., Topcuoglu C., Yilmaz F.M.: Circulating levels of irisin is elevated in hypothyroidism, a case-control study, *Arch Endocrinol Metab*, 2016:0.
14. Gouveia M.C., Vella J.P., Cafeo F.R., i wsp.: Association between irisin and major chronic diseases: a review, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016;20(19):4072-7.
15. Shoukry A., Shalaby S.M., El-Arabi Bdeer S., i wsp.: Circulating serum irisin levels in obesity and type 2 diabetes mellitus, *IUBMB Life*, 2016;68(7):544-56.
16. Stratigou T., Dalamaga M., Antonakos G., i wsp.: Hyperirisinemia is independently associated with subclinical hypothyroidism: correlations with cardiometabolic biomarkers and risk factors, *Endocrine*, 2018;61(1):83-93.
17. Yalcin M.M., Akturk M., Tohma Y., i wsp.: Irisin and Myostatin Levels in Patients with Graves' Disease, *Arch Med Res*, 2016;47(6):471-5.
18. Samy D.M., Ismail C.A., Nassra R.A.: Circulating irisin concentrations in rat models of thyroid dysfunction – effect of exercise, *Metabolism*, 2015;64(7):804-13.
19. Sahin M., Canpolat A.G., Corapcioglu D., i wsp.: Association between circulating irisin levels and epicardial fat in patients with treatment-naïve overt hyperthyroidism, *Biomarkers*, 2018;23(8):742-7.
20. Atici E., Mogulkoc R., Baltaci A.K., Menevse E.: Both hypothyroidism and hyperthyroidism increase plasma irisin levels in rats, *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2018;33(3).
21. Visser W.E., Heemstra K.A., Swagemakers S.M., i wsp.: Physiological thyroid hormone levels regulate numerous skeletal muscle transcripts, *J Clin Endocrinol Metab*, 2009;94(9):3487-96.
22. Rooyackers O.E., Nair K.S.: Hormonal regulation of human muscle protein metabolism, *Annu Rev Nutr*, 1997;17:457-85.

Nowe czynniki białkowo-lipidowe w patomechanizmie preeklampsji łagodnej

Novel protein-lipid factors in the pathomechanism of mild preeclampsia

Karol Charkiewicz

Katedra i Klinika Położnictwa i Perinatologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

W poniższym opisie wyników uwaga zostanie skupiona na nowych, wcześniej słabo albo w ogóle nie zbadanych czynnikach. Dwie publikacje, które są podstawą tego artykułu przeglądowego były finansowane z: Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego w Białymstoku w latach 2013 – 2017 (projekty o numerach: 36/KNOW/2013 i 101/KNOW/2017), Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu Preludium (projekt o numerze: 2015/19/N/NZ5/01434), Naukowej Fundacji Polpharmy w ramach stypendium za najlepszy doktorat wdrożeniowy w roku 2017.

Streszczenie

Celem tego przeglądu była dyskusja nad nowymi białkami i czynnikami lipidowymi oraz ich rolą w patomechanizmie stanu przedrzucawkowego. Omówione w przeglądzie sfingolipidy: Sph (sfingozyna), S1P (sfingozyno-1-fosforan), C20-Cer (ceramid zawierający kwas arachidowy), C18-Cer (ceramid zawierający kwas stearynowy), C16-Cer (ceramid zawierający kwas palmitynowy), C18: 1-cer (ceramid zawierający kwas oleinowy), C22-Cer (ceramid zawierający kwas behenowy) i C24: 1-Cer (ceramid zawierający kwas nerwonowy). Czynniki angiogenne omówione w przeglądzie: Hb-EGF (czynnik wzrostu EGF wiążący się z heparyną), HGF (czynnik wzrostu hepatocytów), LIF (czynnik hamujący białaczkę), leptyna, PDGF-BB (płytkowy czynnik wzrostu BB) i folistatyna. Na podstawie ustaleń z piśmiennictwa wydaje się, że czynniki białkowe i lipidowe mogą odgrywać ważną rolę w patogenezie stanu przedrzucawkowego, a istnieje wiele białek i lipidów, które nie były badane w osoczu kobiet z PE do tej pory. W przeglądzie tym omówiliśmy kilka nowych ścieżek w patomechanizmie stanu przedrzucawkowego.

Słowa kluczowe: preeklampsja, czynniki angiogenne, sfingolipidy

Abstract

The aim of this review was discussion on the new protein and lipid factors and their role in the pathomechanism of preeclampsia. Sphingolipids discussed in the review: Sph (*sphingosine*), S1P (*sphingosine-1-phosphate*), C20-Cer (*ceramides containing arachidic acid*), C18-Cer (*ceramides containing stearic acid*), C16-Cer (*ceramides containing palmitic acid*), C18: 1-Cer (*ceramides containing oleic acid*), C22-Cer (*ceramide containing behenic acid*) and C24: 1-Cer (*ceramides containing nervonic acid*). Angiogenic factors discussed in the review: Hb-EGF (*heparin-binding EGF-like growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*), LIF (*leukaemia inhibitory factor*), leptin, PDGF-BB (*platelet-derived growth factor BB*) and follistatin. Based on literature findings, it seems that protein and lipid factors may play an important

Wpłynęło: 10-01-2019

Zaakceptowano: 10-05-2019

Opublikowano: 20-05-2019

Adres do korespondencji

Karol Charkiewicz
Katedra i Klinika Położnictwa
i Perinatologii, Uniwersytet Medyczny
w Białymstoku,
Marii Skłodowskiej-Curie 24a,
15-276 Białystok,
karol.charkiewicz@umb.edu.pl

role in the pathogenesis of preeclampsia, and there are many proteins and lipids that have not been studied in plasma of women with PE to date. We showed a few new pathways in pathomechanism of preeclampsia.

Key words: preeclampsia, angiogenic factors, sphingolipids

WSTĘP

Preeklampsja (stan przedrzucawkowy, PE) jest chorobą występującą w przypadku 3-5% ciąż w Europie Zachodniej i Ameryce Północnej [1]. Odnotowuje się około 8,5 mln przypadków rocznie na całym świecie [2]; jest najczęstszą przyczyną śmiertelności kobiet w ciąży. Klinicznie schorzenie to wiąże się z nadciśnieniem $\geq 140/90$ mmHg i białkomoczem $\geq 0,3$ g/24 godz., występującymi po 20 tygodniu ciąży, u kobiet z wcześniej stwierdzonym prawidłowym ciśnieniem i brakiem białka w moczu [3]. Ocenia się, że niemal u 35% kobiet z nadciśnieniem ciążowym przed 34 tyg. ciąży rozwinie się preeklampsja. Przebieg stanu przedrzucawkowego jest osobniczo zmienny, może przebiegać z różnym stopniem nasilenia nadciśnienia tętniczego i białkomoczu, lub może być powikłany zespołem HELLP (*hemolytic anemia, elevated liver enzymes, low platelet count*) oraz rzucawką [4]. Do objawów towarzyszących należą uogólnione obrzęki, ból głowy oraz zaburzenia widzenia, a w cięższych przypadkach może wystąpić niewydolność wątroby i nerek, zaburzenia krzepnięcia, zespół niewydolności oddechowej oraz wewnętrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu [3, 4].

Dla prawidłowego wzrostu i rozwoju płodu niezbędna jest przebudowa tętnic spiralnych w ścianie macicy pomiędzy 10 a 16 tygodniem ciąży. W wyniku tych przemian tętnice spiralne zmieniają się z tętnic o niskim przepływie krwi i wysokiej oporności, w tętnice z szybkim przepływem krwi i niskim oporem, zapewniając odpowiedni przepływ krwi przez łożysko, a więc normalny rozwój płodu [5]. W stanie przedrzucawkowym przebudowa ścian naczyń w łożysku jest upośledzona, co powoduje zwężenie tętnic spiralnych i niewystarczające dostarczanie tlenu i składników odżywczych do płodu. W efekcie zahamowany jest prawidłowy rozwój płodu [5]. Niedokrwienie łożyska powoduje uwolnienie czynników białkowych i lipidowych zaburzających równowagę angiogenną, czyli równowagę pomiędzy czynnikami pro i antyangiogennymi [6].

Mimo wielu hipotez, patogeneza stanu przedrzucawkowego nie została jednoznacznie ustalona, a najsukcesowniej „lekarstwem” jest poród [5].

Istnieje wiele czynników ryzyka wystąpienia preeklampsji. Należą do nich m.in.: otyłość, nieprawidłowy profil lipidowy, cukrzyca typu 2, insulinooporność, cukrzyca ciążowa, wiek matki poniżej 20 r.ż. i powyżej 35 r.ż., ciąża mnoga, pierwsza ciąża, płęć męska płodu, zespół antyfosfolipidowy, infekcje dróg moczowych, preeklampsja w wywiadzie rodzinnym, choroby sercowo-naczyniowe występujące przed zajściem w ciążę [1, 7].

W literaturze najbardziej popularne badania omawiają współwystępowanie zespołu metabolicznego i PE [8]. Naukowcy omawiają pośrednią zależność między PE a wzrostem poziomu wolnych kwasów tłuszczowych we krwi pacjentek. Jeśli weźmiemy pod uwagę fakt, że podwyższone poziomy nasycenych kwasów tłuszczowych pobudzają wewnątrzkomórkową syntezę sfingolipidów, można postulować, że sfingolipidy są elementem, który łączy nieprawidłowości lipidowe i stan przedrzucawkowy [9]. Dodatkowo, wiadomo, że IL-6 i TNF-alfa, a także MCP-1 i PAI-1 stymulują lipolizę, a tym samym uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych z tkanki tłuszczowej; wolne kwasy tłuszczowe są substratami do syntezy sfingolipidów [10, 11]. Mogą istnieć dodatkowe zależności między kwasami tłuszczowymi i np. triacyloglicerolami, diacyloglicerolami a obojętnymi lipidami, które są substratami do syntezy biologicznie aktywnych lipidów [12]. Konkretnie, triglicerydy (TG) są jednym z najważniejszych typów lipidów w PE. Niedawno wykazano, że wśród kobiet z łagodną PE, stężenie TG znacząco wzrosło w porównaniu ze zdrowymi kobietami w ciąży. Pozwoliło to zrozumieć zależności pomiędzy kwasami tłuszczowymi i metabolizmem sfingolipidowym oraz ich wpływem na lipotoksyczność w PE [13, 14].

W literaturze sugeruje się, że cytokiny i lipidy mogą być zaangażowane w mechanizm molekularny zainicjowany przez maczyną odpowiedź immunologiczną na płodową część łożyska. Aktywacja układu immunologicznego jest związana z pochodzeniem PE i innymi czynnikami, w tym chemokinami, aktywowanymi neutrofilami i dysfunkcją śródbłonna. Uważa się, że dzięki temu mechanizmowi zaburzenie poziomu biologicznie

aktywnych lipidów jest również związane z patofizjologią tego zespołu [12, 15].

METODYKA

W niniejszym przeglądzie zostaną omówione innowacyjne wyniki badań opublikowane w dwóch artykułach dotyczących analizy 60 czynników angiogenicznych i 11 sfingolipidów:

1. Charkiewicz K., Jasinska E., Goscik J., Koc-Zorawska E., Zorawski M., Kuc P., Raba G., Kluz T., Kalinka J., Sakowicz A., Laudanski P. „Angiogenic factor screening in women with mild preeclampsia – New and significant proteins in plasma”, *Cytokine*, 2017 May [16].
2. Charkiewicz K., Goscik J., Blachnio-Zabielska A., Raba G., Sakowicz A., Kalinka J., Chabowski A., Laudanski P. “Sphingolipids as a new factor in the pathomechanism of preeclampsia – Mass spectrometry analysis”, *PLoS One*, 2017 May [17].

CZYNNIKI ANGIOGENNE I ANALIZA MAKROMACIERZY

Naukowcy przeanalizowali 60 czynników angiogenicznych w osoczu kobiet z preeklampsją łagodną oraz kobiet ciężarnych z niepowikłaną ciążą za pomocą makromacierzy białkowych. Stwierdzono statystycznie istotne zmniejszone stężenie folistatyny w osoczu kobiet z PE. Poziom tego białka w literaturze nie był wyraźnie ustalony dla PE i istnieje wiele sprzecznych doniesień. Keelan i wsp. [18] wykazali podwyższony poziom tego czynnika w surowicy kobiety z PE w porównaniu ze zdrowymi kobietami w ciąży [25], a D’Antona i wsp. [19] nie stwierdzili znaczących różnic między takimi samymi grupami badanymi. Co ciekawe, aktywina A i folistatyna są dynamicznie regulowane podczas ciąży u ludzi i oba białka są zaangażowane w fizjologię ciąży [20]. Folistatyna sama w sobie nie odgrywa znaczącej roli podczas ciąży, ale wiążąc aktywinę A, reguluje jej poziom. Z drugiej strony aktywina A bezpośrednio stymuluje uwalnianie hCG (gonadotropina kosmówkowa) i progesteronu z trofoblastu łożyskowego, folistatyna ma pośredni wpływ na rozwój zarodka i ciążę [21]. Jeśli stężenie folistatyny w PE jest niskie to stężenie białka związanego przez folistatynę, czyli aktywiny A, powinno być wysokie, co ma miejsce w PE. Ponadto folistatyna ma ścisły związek z VEGF (śródbłonkowo-naczyniowy czynnik wzrostu), którego niedobór jest podstawą PE. Badania przeprowadzone przez Oh i wsp. [22] ujawniły, że VEGF ma pozytywny wpływ na ekspresję

geny folistatyny. W naszym badaniu stwierdzono obniżony poziom zarówno VEGF jak i folistatyny w osoczu kobiet z PE. A zatem, obniżony poziom VEGF może być odpowiedzialny za brak ekspresji genu folistatyny, co powoduje niski poziom tego białka w PE.

Ogólnie przyjmuje się, że niedokrwienie łożyska prowadzi do stresu oksydacyjnego i indukuje apoptozę łożyska [23], stymulując matczyną odpowiedź immunologiczną [24]. Saito i in. [25] wykazali brak równowagi między frakcjami limfocytów Th1 i Th2 w krwi obwodowej pacjentek w stanie przedrzucawkowym w porównaniu ze zdrowymi kobietami. Charakterystyczne „przesunięcie preeklampcyjne” w kierunku odporności typu Th1 (w niepowikłanej ciąży dominuje odporność Th2) zostało potwierdzone przez Szarkę i wsp. Autorzy stwierdzili zwiększone stężenie cytokin wytwarzanych przez Th1 [34]. Wyniki badań Charkiewicza i wsp. wykazały podwyższone poziomy niektórych markerów stanu zapalnego, takich jak IFN-gamma (interferon gamma), IL-6 (interleukina 6) i IP-10 (proteina 10 indukowana przez interferon gamma) w PE [25, 26, 27, 28].

Charkiewicz i wsp. odkryli zwiększone poziomy trzech białek w osoczu kobiet z Hb-EGF (czynnik wzrostu EGF wiążący się z heparyną), HGF (czynnik wzrostu hepatocytów), PDGF-BB (płytkowy czynnik wzrostu BB). To odkrycie jest nowym elementem wiedzy o PE. Czynniki odgrywają kluczową rolę w rozwoju ciąży, a w szczególności są zaangażowane w rozprzestrzenianie, migrację i inwazję komórek trofoblastu, a zatem w proces przebudowy tętnic spiralnych w łożysku ciężarnych [29, 30]. Z tego powodu w literaturze naukowej, HB-EGF i HGF są często analizowane w łożysku. Badania wykazały zmniejszenie stężenia HB-EGF i HGF w komórkach mezenchymalnych i cytotrofoblastu [30, 31], co podkreśla rolę tych białek jako promotorów wzrostu łożyska. Wyniki te wydają się sprzeczne z poprzednimi ustaleniami (wzrost poziomu we krwi); jednakże Lala i wsp. [30] stwierdzili, że poziom tych białek w łożysku kobiet z PE nie koreluje z ich poziomem we krwi. Jak widać powyżej, zmniejszone poziomy białek angiogenicznych w łożysku niekoniecznie muszą odzwierciedlać poziomy tych białek we krwi. Robinson i wsp. [32] nie stwierdzili znaczących różnic w stężeniach HGF pomiędzy zdrowymi kobietami w ciąży i kobietami, u których później rozwinęła się PE. Ostatnie badania wskazują, że HGF jest zaangażowany we wzrost i rozrost łożyska, oraz że hamowanie produkcji HGF w modelu zwierzęcym powoduje śmierć wewnątrzmaciczną z powodu niewydolności łożyska [33]. Wyniki tych badań są zgodne z naszymi wynikami. Można założyć, że

wysokie poziomy HGF mogą powodować wysycenie wiążącego receptor białka HGF (S-Met), co z kolei powoduje niski poziom wolnej frakcji S-Met. Drugie białko, HB-EGF, bierze udział w bardzo wczesnych stadiach rozwoju zarodkowego i pojawia się w czwartym dniu ciąży w komórkach nabłonka macicy. Embrionalna indukcja HB-EGF dostarczyła informacji o pierwszych dniach, w których blastocysty wysyłają sygnały w celu przygotowania środowiska macicznego w macicy dla prawidłowego wzrostu zarodka [34]. Dodatkowo naukowcy ujawnili, że ekspresja HB-EGF przez komórki trofoblastu rozwijającego się łożyska wydaje się regulować różnicowanie i zapewniać cytoprotekcję w nieprzyjaznym środowisku [35]. Dlatego nie ma wątpliwości co do nadekspresji HB-EGF we krwi matek, który odgrywa ważną rolę w rozwoju embrionalnym i łożyskowym, ale może prowadzić do nieprawidłowości leżących u podstaw PE. Kolejne białko, mianowicie PDGF-BB, jest mitogennym peptydem, który wraz z estrogenem, odgrywa ważną rolę w regulowaniu prawidłowego przebiegu ciąży, a mianowicie poprzez proliferację komórek mięśniowych i aktywację kinazy tyrozynowej, wapnia oraz kinazy białkowej C [36]. Receptory PDGF znaleziono w tętnicy macicznej podczas ciąży [37, 38]. Meng et al. [39] stwierdzili podwyższone stężenia PDGF-BB w krwi kobiet z PE w porównaniu do zdrowych ciężarnych. PDGF-BB odgrywa rolę w prawidłowej ciąży, ale jego dokładna rola nie jest znana. Można jednak założyć, że zakłócenia w poziomie tego białka wpływają na rozwój stanu przedrzucawkowego. Trudno jest jasno zidentyfikować potencjalne ścieżki molekularne, w przebiegu których mogą rosnąć stężenia HGF, HB-EGF i PDGF-BB. Jednak szczególnie interesujące jest powiązanie tych białek z procesami komórkowej apoptozy, co wykazano w badaniach nad indukcją śmierci komórkowej i guzów [40, 41]. Wydaje się dlatego, że właśnie te trzy białka mogą potencjalnie brać udział w zaburzeniach procesów apoptozy w przebiegu PE.

Charkiewicz i wsp. wykazali zwiększone stężenie białka LIF (czynnik hamujący białaczkę) w osoczu kobiet w stanie przedrzucawkowym. Chociaż nie ma dostępnych w literaturze badań oceniających stężenie LIF w osoczu kobiet z PE, istnieje potencjalne wyjaśnienie wyższych poziomów LIF w naszym eksperymencie. Co ciekawe, Reister i wsp. [42] wykazali wzrost liczby komórek NK (*Natural Killer*) w macicy i wokół tętnic spiralnych kobiet z PE. Van der Meer i wsp. [43] odkryli, że białko LIF jest produkowane przez komórki NK w łożysku ciężarnych. LIF to białko należące do tej samej klasy cytokin co IL-6, a oba odgrywają rolę w rozwoju ciąży poprzez wspomaganie różnicowania doczesnej i łożyska, jak rów-

nież rozwój zarodka [44]. Dodatkowo LIF reguluje funkcje trofoblastu poprzez promowanie proliferacji, inwazji i różnicowania. Sharkey i wsp. stwierdzili wysoki poziom ekspresji receptorów LIF w ludzkim trofoblaście, komórkach śródbłonna kosmków i leukocytach płodowych [45]. U niepłodnych kobiet zaobserwowano również obniżony poziom LIF z uszkodzeniem implantacji [46]. Podsumowując, zarówno nadwyżka jak i deficyt LIF podczas ciąży może prowadzić do zaburzeń początkowego rozwoju płodu i „remodelingu” łożyska.

Stwierdzono również podwyższony poziom leptyny w PE. Wiele badań wydaje się potwierdzać ten wynik. Badania pokazują, że białko to odgrywa znaczącą rolę w fizjologii ciąży [47, 48]. Leptyna jest adipokiną zaangażowaną w modulację uczucia sytości, homeostazy energii i wielu innych procesów podczas ciąży. Leptyna wytwarzana jest przez łożysko, a jej stężenie zwiększają się pod koniec drugiego trymestru ciąży. Dodatkowo wykazano, że leptyna jest ważna dla wymiany matczyno-płodowej, czyli procesy regulujące wzrost i rozwój (matczyny transport aminokwasów przez łożysko płodu) (57,58). U otyłych kobiet w ciąży występuje oporność na leptynę, co hamuje nadmierny transport aminokwasów do płodu. Dlatego naukowcy uważają, że w ciąży u kobiet ze stanem przedrzucawkowym występuje nadprodukcja leptyny, ponieważ stan przedrzucawkowy prowadzi do ograniczenia wzrostu płodu. Podwyższony poziom leptyny może skutkować zwiększeniem transportu aminokwasów do płodu i wpływać na jego wzrost. Może to być potencjalny mechanizm, który zabezpiecza normalny wzrost płodu [49].

SFINGOLIPIDY I ANALIZA TANDEMOWĄ SPEKTROMETRIĄ MAS

Sfingolipidy, zwłaszcza ceramidy, są biologicznie czynnymi lipidami, które biorą udział w wielu procesach metabolicznych w organizmie człowieka. Jedną z ich funkcji jest transdukcja sygnału w apoptozie i autofagii komórkowej [52, 53]. Wiadomo, że w patogenezie PE decydującą rolę odgrywa nieprawidłowa implantacja trofoblastu w tętnicach spiralnych macicy, co prowadzi do niedokrwienia łożyska i stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji prowadzi do apoptoz komórek, uwolnieniem czynników łożyskowych (w tym zapalnych białek) i brakiem równowagi pomiędzy czynnikami pro- i antyangiogennymi [54, 55, 56]. Ze względu na stres oksydacyjny i zaburzone procesy apoptozy w stanie przedrzucawkowym można założyć, że sfingolipidy mogą odgrywać znaczącą rolę w patogenezie PE.

Co ciekawe, Charkiewicz i wsp. wskazali na brak znaczących różnic w poziomach sfingolipidów wśród trzech frakcji krwi. Przed eksperymentem naukowcy postawili hipotezę, że sfingolipidy mogą być uwalniane z łożyska do krwi kobiet z PE [57, 58, 59]. Wskazuje to na brak zwiększonej syntezy sfingolipidów w płytkach krwi i erytrocytach, wstępnie potwierdzając hipotezę dotyczącą łożyskowego źródła sfingolipidów.

Teoria ta wydaje się potwierdzona w innym badaniu. Melland-Smith i wsp. odkryli zwiększoną ilość ceramidów w łożysku kobiet ze stanem przedrzucawkowym (72). Ich analiza wykazała znaczący wzrost różnych ceramidów, z wyjątkiem C22-Cer, w łożysku kobiet z PE w porównaniu z łożyskami kontrolnymi: C16-Cer, C18-Cer, C20-Cer i C24-Cer [60]. Ten sam wynik w badaniu zawartości ceramidów w łożysku kobiet z PE uzyskali inni naukowcy [61]. Co ciekawe, Romanowicz i wsp. [62] wykazali statystycznie istotny spadek poziomu ceramidów w tętnicy pępowinowej; w szczególności wykazano zmniejszenie całkowitej ilości ceramidów i zmniejszenie poziomów poszczególnych ceramidów, takich jak C12-Cer, C14-Cer, C16-Cer, C18-Cer, C14: 1-Cer, C18: 2 -Cer, C20: 4-Cer i C20: 5-Cer. Stwierdzono również wzrost poziomu sfinganiny w tętnicach pępowinowych u kobiet z stanem przedrzucawkowym [63]. Rok później Romanowicz i wsp. [63] odkryli interesujący wynik w trakcie badań nad zawartością sfingolipidów w galarecie Whartona, substancji otaczającej naczynia pępowinowe, aby chronić je przed rozszerzaniem, zginaniem, skręcaniem i ściskaniem. Wykazali wzrost poziomu sfingozyno-1-fosforanu, sfingozyny i sfinganiny w galarecie Whartona w pępowinie u kobiet z PE w porównaniu do grupy kontrolnej [63]. Badania te nie są w rzeczywistości przeciwstawne do tych wymienionych powyżej, ponieważ można założyć, że istnieje pewien patomechanizm, który łączy: wzrost zawartości sfingolipidów w tkance łożyska, zmniejszone poziomy sfingolipidów w tętnicy pępowinowej i zwiększone poziomy w galarecie Whartona. Związek ten należało by na pewno szczegółowo przeanalizować w przyszłości. Warto także zauważyć, że związek sfingolipidów w różnych częściach łożyska nie jest bezpośredni, ponieważ tętnica pępowinowa i galareta Whartona nie są bezpośrednio połączone z tętnicami spiralnymi.

W międzynarodowej literaturze naukowej niewiele jest badań nad sfingolipidami w osoczu kobiet z PE; jest to bardzo słabo zbadany temat. W badaniach Charkiewicza wykazano statystycznie istotny wzrost ośmiu sfingolipidów w osoczu kobiet z PE: Sph (sfingozyna), S1P (sfingozyno-1-fosforan), C20-Cer (ceramid zawierający kwas arachidowy), C18-

-Cer (ceramid zawierający kwas stearynowy), C16-Cer (ceramid zawierający kwas palmitynowy), C18: 1-cer (ceramid zawierający kwas oleinowy), C22-Cer (ceramid zawierający kwas behenowy) i C24: 1-Cer (ceramid zawierający kwas nerwonowy). Uzyskane wyniki potwierdziły dane otrzymane w innych badaniach, ujawniające podwyższony poziom ceramidów, w tym C16-Cer, C18-Cer, C20-Cer i C24-Cer, w osoczu pacjentów z PE w porównaniu z kobietami z grupy kontrolnej [60]. Jednak badania te wykazały spadek S1P w surowicy kobiet z PE, co jest sprzeczne z naszym badaniem – wykazanie podwyższonego poziomu S1P w osoczu kobiet z PE.

Sigruener i wsp. [64] przeprowadzili jedno z największych badań kohortowych o akronimie LURIC (*Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health*) (3600 osobników), które miało na celu określenie śmiertelności i zachorowalności w odniesieniu do poszczególnych gatunków sfingolipidów w różnych chorobach powiązanych z zespołem metabolicznym. Wykazano, że różnice w lipotoksyczności poszczególnych krótkołańcuchowych rodzajów ceramidów i ich podobieństwo do krótkołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych są odpowiedzialne za stres oksydacyjny retikulum endoplazmatycznego, uszkodzenie mitochondrialne, a następnie aktywację autofagii i apoptozy. Naukowcy ujawnili, że pięć gatunków ceramidów było znacząco związanych ze śmiertelnością: trzy wykazały pozytywne powiązanie ze śmiertelnością (16:0, 18:0, 24:1), a pozostałe dwa gatunki Cer (23:0, 24:0) odgrywały potencjalnie ochronną funkcję. Fosfatydylocholina (PC) 32:0 (prawdopodobnie PC 16:0/16:0) i sfingomielina (SM 16:0) wraz z Cer 24:1 wykazały najsilniejsze pozytywne związki ze śmiertelnością. Co ciekawe, podobne tendencje zaobserwowano dla gatunków 16:0, 23:0, 24:0 i 24:1 SM i Cer. Wyniki te wyraźnie pokazują, że ceramidy odgrywają główną rolę w lipotoksyczności [64].

Jak wspomniano wyżej, sfingolipidy odgrywają ważną rolę w apoptozie, stresie oksydacyjnym i autofagii komórkowej, dlatego nasze wyniki pokazujące podwyższony poziom długołańcuchowych ceramidów pośrednio potwierdzają tę teorię. Young i wsp. zauważyli, że ceramidy Sph, C16, C18 i C20 odgrywają istotną rolę w procesach antyproliferacyjnych, a ceramidy C16 i C18 są również proapoptotyczne. Co ciekawe, niektóre sfingolipidy, takie jak S1P, działają przeciwnie do długołańcuchowych ceramidów i "przełączają" autofagię w kierunku przeżycia komórki poprzez aktywację ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*) i supresję aktywacji JNK indukowanej ceramidem [65]. Tak więc podwyższony poziom S1P w PE może być mechanizmem kompen-

sacyjnym i przeciwdziałającym dla ceramidów proapoptotycznych. Ponadto ceramid C24:1 ma działanie proliferacyjne, dlatego może działać podobnie do S1P (efekt kompensacyjny) [66]. S1P indukuje również aktywację mediatorów stanu zapalnego, takich jak VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein 1*), ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) i COX (*Cyclooxygenase*), które są podwyższone w krwi i łożysku w stanie przedrzucawkowym [67, 68, 69]. Ceramidy Sph, C16, C18 i C20 aktywują apoptozę poprzez szlak mitochondrialny z proapoptotycznym białkiem Bax, jednakże, sfingozyna aktywuje w pierwszej kolejności szlak apoptozy lizosomu [30]. Naukowcy wykazali również znaczący wzrost poziomu ceramidów C24: 1 i C24: 0 w osoczu u ludzi z nadciśnieniem, sugerując dodatkowo ich rolę w PE [70].

Sfingolipidy są również zaangażowane w zależne od śródbłonna uwalnianie tromboksanu A₂ (TXA₂), przyczyniając się do dysfunkcji śródbłonna i podniesienia tętniczego ciśnienia krwi [70]. Podwyższony poziom TXA₂ jest jednym z biochemicznych markerów rozwoju stanu przedrzucawkowego [71]. Chen i wsp. stwierdzili zwiększoną koncentrację TXA₂ (rola aktywacji agregacji płytek) w osoczu kobiet z PE i obniżenie stężenia prostacykliny PGI₂ (rola rozszerzenia naczyń krwionośnych i hamowanie agregacji płytek) [72]. S1P jest wytwarzany głównie przez płytki krwi, a agregacja płytek stymulowana przez TXA₂ może po-

wodować małopłytkowość [72]. W przeciwieństwie do naszego badania, Melland-Smith i wsp. wykazali obniżone poziomy S1P w surowicy kobiet z PE; to odkrycie można tłumaczyć niską liczbą płytek krwi u kobiet z PE [60]. Jednak taki mechanizm nie koniecznie odgrywa potencjalną rolę, ponieważ wykazano, że w łagodnej PE (badanej przez nasz zespół) nie zawsze występuje trombocytopenia [73].

Co więcej, ceramidy, które należą do najważniejszych sfingolipidów, biorą udział w hamowaniu wzrostu i apoptozie tkanek serca i naczyń krwionośnych, ze względu na ich wpływ na receptory angiotensyny II typu 2, które odgrywają istotną rolę w regulacji ciśnienia krwi [74, 75].

W powyższych pracach wykazano, że wybrane sfingolipidy i czynniki angiogenne mogą być brane pod uwagę jako istotnie odgrywające rolę w różnych procesach komórkowych w przebiegu stanu przedrzucawkowego. W literaturze międzynarodowej zbyt mało badań skupiło się na roli sfingolipidów w patogenezie tej choroby. Jednakże, ze względu na złożoność patomechanizmów odpowiedzialnych za stan przedrzucawkowy, należy przeprowadzić dalsze eksperymenty celem potwierdzenia potencjalnej roli wybranych czynników angiogennych i sfingolipidów oraz ich wzajemnych zależności mogących mieć wpływ na przebieg choroby.

PIŚMIENNICTWO

1. J. M. Davison *et al.*, "New Aspects in the Pathophysiology of Preeclampsia," (in en), 2004-09-01 2004.
2. U. D. Anderson, M. G. Olsson, K. H. Kristensen, B. Akerstrom, and S. R. Hansson, "Review: Biochemical markers to predict preeclampsia," (in eng), *Placenta*, vol. 33 Suppl, pp. S42-7, Feb 2012.
3. Y. J. Kim, "Pathogenesis and promising non-invasive markers for preeclampsia," (in Eng), *Obstet Gynecol Sci*, vol. 56, no. 1, pp. 2-7, Jan 2013.
4. B. C. Young, R. J. Levine, and S. A. Karumanchi, "Pathogenesis of preeclampsia," (in eng), *Annu Rev Pathol*, vol. 5, pp. 173-92, 2010.
5. D. M. Carty, C. Delles, and A. F. Dominiczak, "Novel Biomarkers for Predicting Preeclampsia," (in eng), *Trends Cardiovasc Med*, vol. 18, no. 5-24, pp. 186-94, Jul 2008.
6. E. S. Lee *et al.*, "The levels of circulating vascular endothelial growth factor and soluble Flt-1 in pregnancies complicated by preeclampsia," (in eng), *J Korean Med Sci*, vol. 22, no. 1, pp. 94-8, Feb 2007.
7. N. Sattar and I. A. Greer, "Pregnancy complications and maternal cardiovascular risk: opportunities for intervention and screening?," (in eng), *Bmj*, vol. 325, no. 7356, pp. 157-60, Jul 20 2002.
8. D. M. Carty *et al.*, "Urinary proteomics for prediction of preeclampsia," (in eng), *Hypertension*, vol. 57, no. 3, pp. 561-9, Mar 2011.
9. W. L. Holland and S. A. Summers, "Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism," (in eng), *Endocr Rev*, vol. 29, no. 4, pp. 381-402, Jun 2008.
10. D. P. Koonen, J. F. Glatz, A. Bonen, and J. J. Luiken, "Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle," (in eng), *Biochim Biophys Acta*, vol. 1736, no. 3, pp. 163-80, Oct 2005.
11. S. C. Kang, B. R. Kim, S. Y. Lee, and T. S. Park, "Sphingolipid metabolism and obesity-induced inflammation," (in eng), *Front Endocrinol (Lausanne)*, vol. 4, p. 67, 2013.
12. K. R. Bounds, M. K. Newell-Rogers, and B. M. Mitchell, "Four Pathways Involving Innate Immunity in the Pathogenesis of Preeclampsia," (in eng), *Front Cardiovasc Med*, vol. 2, p. 20, 2015.

13. I. Siddiqui, "Maternal Serum Lipids in Women with Preeclampsia," (in eng), *Ann Med Health Sci Res*, vol. 4, no. 4, pp. 638-41, Jul 2014.
14. V. J. Lima, C. R. Andrade, G. E. Ruschi, and N. Sass, "Serum lipid levels in pregnancies complicated by preeclampsia," (in eng), *Sao Paulo Med J*, vol. 129, no. 2, pp. 73-6, Mar 2011.
15. E. Laresgoiti-Servitje, "A leading role for the immune system in the pathophysiology of preeclampsia," (in eng), *J Leukoc Biol*, vol. 94, no. 2, pp. 247-57, Aug 2013.
16. K. Charkiewicz *et al.*, "Angiogenic factor screening in women with mild preeclampsia – New and significant proteins in plasma," (in eng), *Cytokine*, Oct 2017.
17. K. Charkiewicz *et al.*, "Sphingolipids as a new factor in the pathomechanism of preeclampsia – Mass spectrometry analysis," (in eng), *PLoS One*, vol. 12, no. 5, p. e0177601, 2017.
18. J. A. Keelan, R. Taylor, J. C. Schellenberg, N. P. Groome, M. D. Mitchell, and R. A. North, "Serum activin A, inhibin A, and follistatin concentrations in preeclampsia or small for gestational age pregnancies," (in eng), *Obstet Gynecol*, vol. 99, no. 2, pp. 267-74, Feb 2002.
19. D. D'Antona *et al.*, "Increased maternal serum activin A but not follistatin levels in pregnant women with hypertensive disorders," (in eng), *J Endocrinol*, vol. 165, no. 1, pp. 157-62, Apr 2000.
20. T. K. Woodruff, P. Sluss, E. Wang, I. Janssen, and M. S. Mersol-Barg, "Activin A and follistatin are dynamically regulated during human pregnancy," (in eng), *J Endocrinol*, vol. 152, no. 2, pp. 167-74, Feb 1997.
21. F. Petraglia *et al.*, "Presence and synthesis of inhibin subunits in human decidua," (in eng), *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 71, no. 2, pp. 487-92, Aug 1990.
22. H. G. K. In Suk Oh, "Vascular endothelial growth factor upregulates follistatin in human um," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 9, no. 3, pp. 201-206, 2016.
23. L. Myatt and R. P. Webster, "Vascular biology of preeclampsia," (in eng), *J Thromb Haemost*, vol. 7, no. 3, pp. 375-84, Mar 2009.
24. A. N. Sharp, A. E. Heazell, I. P. Crocker, and G. Mor, "Placental apoptosis in health and disease," (in eng), *Am J Reprod Immunol*, vol. 64, no. 3, pp. 159-69, Sep 2010.
25. S. Saito, M. Sakai, Y. Sasaki, K. Tanebe, H. Tsuda, and T. Michimata, "Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia," (in eng), *Clin Exp Immunol*, vol. 117, no. 3, pp. 550-5, Sep 1999.
26. A. Szarka, J. Rigo, Jr., L. Lazar, G. Beko, and A. Molvarec, "Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array," (in eng), *BMC Immunol*, vol. 11, p. 59, 2010.
27. L. De Oliveira, N. O. Câmara, J. C. Peraçoli, M. T. Peraçoli, A. F. Moron, and N. Sass, "sFlt-1 and IP-10 in women with early-onset preeclampsia," (in eng), *Pregnancy Hypertens*, vol. 1, no. 2, pp. 129-31, Apr 2011.
28. A. Kumar, N. Begum, S. Prasad, S. Agarwal, S. Sharma, "IL-10, TNF- α & IFN- γ : potential early biomarkers for preeclampsia," (in eng), *Cell Immunol*, vol. 283, no. 1-2, pp. 70-4, 2013 May-Jun 2013.
29. G. Xu, M. J. Guimond, C. Chakraborty, and P. K. Lala, "Control of proliferation, migration, and invasiveness of human extravillous trophoblast by decorin, a decidua product," (in eng), *Biol Reprod*, vol. 67, no. 2, pp. 681-9, Aug 2002.
30. P. K. Lala and C. Chakraborty, "Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury," (in eng), *Placenta*, vol. 24, no. 6, pp. 575-87, Jul 2003.
31. R. E. Leach, B. Kilburn, J. Wang, Z. Liu, R. Romero, and D. R. Armant, "Heparin-binding EGF-like growth factor regulates human extravillous cytotrophoblast development during conversion to the invasive phenotype," (in eng), *Dev Biol*, vol. 266, no. 2, pp. 223-37, Feb 2004.
32. J. D. Robinson Christopher, "Hepatocyte growth factor as a second trimester marker for preeclampsia," vol. 195, no. 6, p. S157, December 2006.
33. X. Zeng *et al.*, "Plasma level of soluble c-Met is tightly associated with the clinical risk of preeclampsia," (in eng), *Am J Obstet Gynecol*, vol. 201, no. 6, pp. 618.e1-7, Dec 2009.
34. H. J. Lim and S. K. Dey, "HB-EGF: a unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation," (in eng), *Exp Cell Res*, vol. 315, no. 4, pp. 619-26, Feb 2009.
35. P. Jessmon, R. E. Leach, and D. R. Armant, "Diverse functions of HBEGF during pregnancy," (in eng), *Mol Reprod Dev*, vol. 76, no. 12, pp. 1116-27, Dec 2009.
36. L. E. Keyes, L. G. Moore, S. J. Walchak, and E. C. Dempsey, "Pregnancy-stimulated growth of vascular smooth muscle cells: importance of protein kinase C-dependent synergy between estrogen and platelet-derived growth factor," (in eng), *J Cell Physiol*, vol. 166, no. 1, pp. 22-32, Jan 1996.
37. H. Rodriguez-Martinez, E. Persson, M. Hurst, and P. Stanchev, "Immunohistochemical localization of platelet-derived growth factor receptors in the porcine uterus during the oestrous cycle and pregnancy," (in eng), *Zentralbl Veterinarmed A*, vol. 39, no. 1, pp. 1-10, Feb 1992.
38. A. E. Mendoza, R. Young, S. H. Orkin, and T. Collins, "Increased platelet-derived growth factor A-chain expression in human uterine smooth muscle cells during the physiologic hypertrophy of pregnancy," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 87, no. 6, pp. 2177-81, Mar 1990.
39. H. Meng, F. F. Zhu, C. H. Wang, and G. X. Xiao, "[Role of platelet-derived growth factor in the pathogenesis of preeclampsia]," (in chi), *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, vol. 27, no. 8, pp. 1274-6, Aug 2007.
40. T. Okura *et al.*, "Platelet-derived growth factor induces apoptosis in vascular smooth muscle cells: roles of the Bcl-2 family," (in ENG), *Biochim Biophys Acta*, vol. 1403, no. 3, pp. 245-53, Jul 1998.
41. E. A. Conner, T. Teramoto, P. J. Wirth, A. Kiss, S. Garfield, and S. S. Thorgeirsson, "HGF-mediated apoptosis via p53/bax-independent pathway activating JNK1," (in ENG),

- Carcinogenesis*, vol. 20, no. 4, pp. 583-90, Apr 1999.
42. F. Reister *et al.*, "Altered protease expression by periarterial trophoblast cells in severe early-onset preeclampsia with IUGR," (in eng), *J Perinat Med*, vol. 34, no. 4, pp. 272-9, 2006.
 43. A. van der Meer *et al.*, "Membrane-bound HLA-G activates proliferation and interferon-gamma production by uterine natural killer cells," (in eng), *Mol Hum Reprod*, vol. 10, no. 3, pp. 189-95, Mar 2004.
 44. X. H. Liang *et al.*, "Egr1 protein acts downstream of estrogen-leukemia inhibitory factor (LIF)-STAT3 pathway and plays a role during implantation through targeting Wnt4," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 289, no. 34, pp. 23534-45, Aug 2014.
 45. A. M. Sharkey *et al.*, "Localization of leukemia inhibitory factor and its receptor in human placenta throughout pregnancy," (in ENG), *Biol Reprod*, vol. 60, no. 2, pp. 355-64, Feb 1999.
 46. E. B. Cullinan, S. J. Abbondanzo, P. S. Anderson, J. W. Pollard, B. A. Lessey, and C. L. Stewart, "Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation," (in eng), *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, no. 7, pp. 3115-20, Apr 1996.
 47. Y. Atamer, Y. Koçyigit, B. Yokus, A. Atamer, and A. C. Erden, "Lipid peroxidation, antioxidant defense, status of trace metals and leptin levels in preeclampsia," (in eng), *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, vol. 119, no. 1, pp. 60-6, Mar 2005.
 48. F. Mumtaz *et al.*, "Role of serum leptin level as a marker of severity of pre eclampsia," (in eng), *J Ayub Med Coll Abbottabad*, vol. 20, no. 1, pp. 13-5, 2008 Jan-Mar 2008.
 49. D. R. Tessier, Z. M. Ferraro, and A. Gruslin, "Role of leptin in pregnancy: consequences of maternal obesity," (in eng), *Placenta*, vol. 34, no. 3, pp. 205-11, Mar 2013.
 50. K. Koga *et al.*, "Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia," (in eng), *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 88, no. 5, pp. 2348-51, May 2003.
 51. T. Chaiworapongsa *et al.*, "Evidence supporting a role for blockade of the vascular endothelial growth factor system in the pathophysiology of preeclampsia. Young Investigator Award," (in eng), *Am J Obstet Gynecol*, vol. 190, no. 6, pp. 1541-7; discussion 1547-50, Jun 2004.
 52. Y. A. Hannun, "Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress," (in eng), *Science*, vol. 274, no. 5294, pp. 1855-9, Dec 1996.
 53. M. M. Young, M. Kester, and H. G. Wang, "Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy," (in eng), *J Lipid Res*, vol. 54, no. 1, pp. 5-19, Jan 2013.
 54. R. Thadhani *et al.*, "First trimester placental growth factor and soluble fms-like tyrosine kinase 1 and risk for preeclampsia," (in eng), *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 89, no. 2, pp. 770-5, Feb 2004.
 55. N. Soleymanlou *et al.*, "Molecular evidence of placental hypoxia in preeclampsia," (in eng), *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 90, no. 7, pp. 4299-308, Jul 2005.
 56. C. W. Redman and I. L. Sargent, "Latest advances in understanding preeclampsia," (in eng), *Science*, vol. 308, no. 5728, pp. 1592-4, Jun 2005.
 57. A. H. Merrill, "De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 277, no. 29, pp. 25843-6, Jul 2002.
 58. K. Kitatani *et al.*, "Acid beta-glucosidase 1 counteracts p38delta-dependent induction of interleukin-6: possible role for ceramide as an anti-inflammatory lipid," (in eng), *J Biol Chem*, vol. 284, no. 19, pp. 12979-88, May 2009.
 59. Y. A. Hannun and L. M. Obeid, "Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids," (in eng), *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 9, no. 2, pp. 139-50, Feb 2008.
 60. M. Melland-Smith *et al.*, "Disruption of sphingolipid metabolism augments ceramide-induced autophagy in preeclampsia," (in eng), *Autophagy*, vol. 11, no. 4, pp. 653-69, Apr 2015.
 61. I. C. Leonardo Ermini, Megan Melland-Smith, Martin Post, "Mass Spectrometry Imaging of Sphingolipids in Preeclamptic Placentae," vol. 34, no. 9, p. A10, September 2013.
 62. L. Romanowicz and E. Bańkowski, "Preeclampsia-associated alterations in sphingolipid composition of the umbilical cord artery," (in eng), *Clin Biochem*, vol. 42, no. 16-17, pp. 1719-24, Nov 2009.
 63. L. Romanowicz and E. Bańkowski, "Altered sphingolipid composition in Wharton's jelly of pre-eclamptic newborns," (in eng), *Pathobiology*, vol. 77, no. 2, pp. 78-87, 2010.
 64. A. Sigrüener, M. E. Kleber, S. Heimerl, G. Liebisch, G. Schmitz, and W. Maerz, "Glycerophospholipid and sphingolipid species and mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study," (in eng), *PLoS One*, vol. 9, no. 1, p. e85724, 2014.
 65. O. Cu villier *et al.*, "Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate," (in eng), *Nature*, vol. 381, no. 6585, pp. 800-3, Jun 1996.
 66. D. Hartmann *et al.*, "Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth," (in eng), *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 44, no. 4, pp. 620-8, Apr 2012.
 67. A. Yogi *et al.*, "Sphingosine-1-phosphate-induced inflammation involves receptor tyrosine kinase transactivation in vascular cells: upregulation in hypertension," (in eng), *Hypertension*, vol. 57, no. 4, pp. 809-18, Apr 2011.
 68. S. Y. Kim *et al.*, "Maternal serum levels of VCAM-1, ICAM-1 and E-selectin in preeclampsia," (in eng), *J Korean Med Sci*, vol. 19, no. 5, pp. 688-92, Oct 2004.
 69. B. Wetzka, R. Nüsing, D. S. Charnock-Jones, W. Schäfer, H. P. Zahradnik, and S. K. Smith, "Cyclooxygenase-1 and -2 in human placenta and placental bed after normal and pre-eclamptic pregnancies," (in eng), *Hum Reprod*, vol. 12, no. 10, pp. 2313-20, Oct 1997.
 70. L. J. Spijkers *et al.*, "Hypertension is associated with marked alterations in sphingolipid biology: a potential role

- for ceramide," (in eng), *PLoS One*, vol. 6, no. 7, p. e21817, 2011.
71. H. S. Liu, T. Y. Chu, M. H. Yu, Y. K. Chang, C. S. Ko, and C. F. Chao, "Thromboxane and prostacyclin in maternal and fetal circulation in pre-eclampsia," (in eng), *Int J Gynaecol Obstet*, vol. 63, no. 1, pp. 1-6, Oct 1998.
72. G. Chen, R. Wilson, G. Cumming, J. J. Walker, and J. H. McKillop, "Production of prostacyclin and thromboxane A2 in mononuclear cells from preeclamptic women," (in eng), *Am J Obstet Gynecol*, vol. 169, no. 5, pp. 1106-11, Nov 1993.
73. R. Neiger, S. A. Contag, and D. R. Coustan, "Preeclampsia effect on platelet count," (in eng), *Am J Perinatol*, vol. 9, no. 5-6, pp. 378-80, 1992 Sep-Nov 1992.
74. S. Borodzicz, K. Czarzasta, M. Kuch, and A. Cudnoch-Jedrzejewska, "Sphingolipids in cardiovascular diseases and metabolic disorders," (in eng), *Lipids Health Dis*, vol. 14, p. 55, 2015.
75. C. Berry, R. Touyz, A. F. Dominiczak, R. C. Webb, and D. G. Johns, "Angiotensin receptors: signaling, vascular pathophysiology, and interactions with ceramide," (in eng), *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 281, no. 6, pp. H2337-65, Dec 2001.

Cyklodekstryny jako wielofunkcyjne substancje pomocnicze

Cyclodextrins as multifunctional excipients

Magdalena Paczkowska,
Judyta Cielecka-Piontek

Katedra i Zakład Farmakognozji, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie

Cyklodekstryny są to substancje pomocnicze, które mogą tworzyć kompleksy inkluzyjne. Stosowane są głównie w celu zwiększenia rozpuszczalności aktywnych substancji biologicznych, co w następstwie powoduje wzrost biodostępności. Ponadto mogą one maskować smak i zapach, wpływać na modyfikację właściwości biologicznych oraz zwiększać trwałość chemiczną.

Celem badań było wyznaczenie możliwości zastosowania cyklodekstryn jako substancji modyfikujących trwałość chemiczną modelowych labilnych substancji biologicznie czynnych, dla których uprzednio udowodniono podatność na rozkład w warunkach hydrolizy kwasowo-zasadowej (meropenem), termolizy (meropenem), utleniania (cetyryzyna) czy fotolizy (rutyna). Rozszerzeniem prowadzonych badań była równoległa ocena wpływu cyklodekstryn na wybrane właściwości fizykochemiczne i biologiczne istotne z racji możliwości modyfikowania istotnych właściwości farmaceutycznych.

W pierwszym etapie przeprowadzono preparatykę układów labilnych substancji biologicznie czynnych z β -cyklodekstryną, stosując metody ugniatania oraz mieszania na sucho. Następnie potwierdzono tożsamość otrzymanych układów, stosując metody spektralne (UV, FT-IR, Raman, XRPD), termiczne (DSC) oraz mikroskopowe (SEM).

Do oceny zmian stężeń modelowych labilnych substancji biologicznie czynnych opracowano i zwalidowano metody analityczne (metoda UV dla meropenemu, HILIC dla cetyryzyny oraz UHPLC-DAD dla rutyny), które zostały zastosowane podczas badań trwałości, rozpuszczalności, przenikalności przez układy sztucznych błon biologicznych.

Przeprowadzone badania potwierdzają możliwość modyfikacji trwałości chemicznej labilnych substancji biologicznie czynnych w warunkach hydrolizy kwasowo-zasadowej, termolizy, utleniania oraz fotolizy. Potwierdzają również wpływ obecności układów inkluzyjnych opartych na układach cyklodekstrynowych na parametry istotne z punktu widzenia innych właściwości farmaceutycznych substancji czynnych, szczególnie takich jak dynamika rozpuszczania, szybkość rozpuszczania, przenikalność, a w końcu biodostępność.

Słowa kluczowe: cyklodekstryny, stabilność termiczna, meropenem, cetyryzyna, rutyna

Abstract

Cyclodextrins are pharmaceutical excipients which can form inclusion complexes. They are mainly used to increase the solubility of active phar-

Wpłynęło: 10-01-2019
Zaakceptowano: 10-05-2019
Opublikowano: 20-05-2019

Adres do korespondencji
dr n. farm. Magdalena Paczkowska,
Katedra i Zakład Farmakognozji,
Uniwersytet Medyczny im. Karola
Marcinkowskiego w Poznaniu,
ul. Święcickiego 4, 61-781 Poznań;
e-mail: magda.paczowska@gmail.com

maceutical ingredients, which causes increased bioavailability. In addition, they can mask the taste and smell, affect the modification of biological properties and increase its chemical stability.

The aim of the studies was to determine the possibility of using cyclodextrins as substances modifying chemical stability of model labile active pharmaceutical ingredients for which the susceptibility to degradation in acid-base hydrolysis (meropenem), thermolysis (meropenem), oxidation (cetirizine) or photolysis (rutin) has been previously proven. The extension of the research was a parallel assessment of the effect of cyclodextrin on selected physicochemical and biological properties important due to the possibility of modifying the pharmaceutical properties of selected model labile active pharmaceutical ingredients.

In the first stage, preparations of labile systems of active pharmaceutical ingredients with β -cyclodextrin were carried out using kneading and dry mixing methods. Next, the identity of the obtained systems was confirmed using spectral (UV, FT-IR, Raman, XRPD), thermal (DSC) and microscopic (SEM) methods.

The analytical methods (UV method for meropenem, HILIC for cetirizine and UHPLC-DAD for rutin) have been developed and validated to assess the changes in the concentration of model labile active pharmaceutical ingredients during stability, solubility and permeability studies through artificial biological membranes.

The conducted research confirms the possibility of modifying the chemical stability of labile active pharmaceutical ingredients under acid-base hydrolysis conditions, thermolysis, oxidation and photolysis. They also confirm the beneficial effect of the presence of inclusion systems based on cyclodextrin systems on parameters for other pharmaceutical properties of active substances, especially such as dissolution dynamics, dissolution rate, permeability and eventually bioavailability.

Key words: cyclodextrin, chemical stability, meropenem, cetirizine, rutin

Wykaz skrótów:

API (ang. *Active Pharmaceutical Ingredient*) – substancja czynna; BCS (ang. *Biopharmaceutics Classification System*) – biofarmaceutyczny system klasyfikacji substancji czynnych; DSC (ang. *Differential Scanning Calorimetry*) – różnicowa kalorymetria skaningowa; EPR (ang. *Electron Paramagnetic Resonance*) – elektronowy rezonans paramagnetyczny; FT-IR (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) – spektroskopia w podczerwieni; HILIC (ang. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) – chromatografia cieczowa oddziaływań hydrofilowych; MIC (ang. *Minimum Inhibitory Concentration*) – minimalne stężenie hamujące; PAMPA (ang. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) – równoległy test przepuszczalności przez sztuczne błony; Raman (ang. *Raman Spectroscopy*) – spektroskopia Raman; SEM (ang. *Scanning Electron Microscope*) – skaningowy mikroskop elektronowy; UV (ang. *Ultraviolet Spectroscopy*) – spektroskopia w nadfiolecie; XRPD (ang. *X-ray Powder Diffraction*) – rentgenowska dyfraktometria proszkowa

WSTĘP

Jednym z intensywnych kierunków badań w obszarze projektowania nowych postaci leku jest poszukiwanie metod modyfikacji w kierunku „korzystniejszych” właściwości fizykochemicznych substancji leczniczych. Chemiczna nietrwałość wielu substancji czynnych stanowi często ograniczenie dla ich farmaceutycznego zastosowania. Do pozostałych istotnych ograniczeń w zastosowaniu API mogą należeć: słaba rozpuszczalność, słaba zdolność przenikania przez błony biologiczne oraz niekorzystne właściwości organoleptyczne. Redukcja tych ograniczeń może być realizowana poprzez zmiany samego API, głównie w wyniku modyfikacji struktury chemicznej np. poprzez otrzymanie postaci jonowej lub postaci estrów, lub łączenie API z substancjami pomocniczymi, w efekcie czego powstają układy dostarczania substancji (ang. *drug delivery system*) albo poprzez zastosowanie odpowiednich formułacji farmaceutycznych.

Jednymi z cennych modyfikatorów właściwości fizykochemicznych API w odniesieniu do możliwości zmiany rozpuszczalności, przenikalności, zmniejszenia podrażnienia przewodu pokarmowego lub oczu, czy nawet eliminacji nieprzyjemnego zapachu i smaku są cyklodekstryny. Cyklodekstryny są cyklicznymi oligosacharydami, powstającymi podczas enzymatycznej degradacji skrobi. Naturalnymi cyklodekstrynami są: α -cyklodekstryna, β -cyklodekstryna oraz γ -cyklodekstryna, zbudowane odpowiednio z 6, 7 i 8 jednostek D-glukopiranoz (rysunek 1) [1-3].

Budowa chemiczna cyklodekstryn determinuje ich właściwości. Rozmieszczenie grup hydroksylowych na zewnątrz pierścienia nadaje cząsteczce cyklodekstryny charakter hydrofilowy. Natomiast jej wnętrze, z powodu obecności atomów węgla, atomów wodoru i mostków tlenowych (niewiążące pary elektronowe), ma cha-

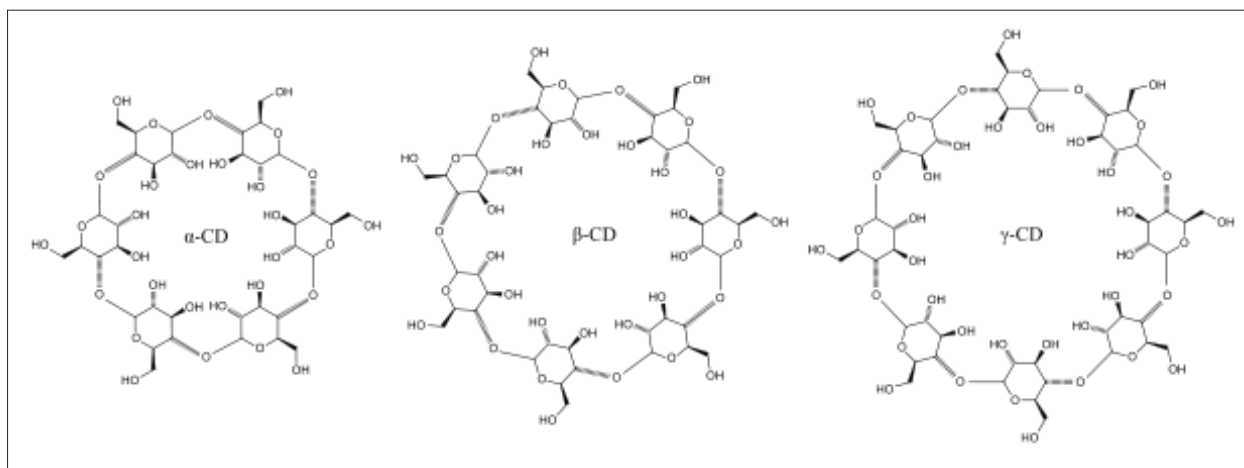
rakter hydrofobowy (niepolarny). Dzięki takiej budowie chemicznej cyklodekstryny mogą tworzyć z wieloma substancjami chemicznymi, w tym API, rozpuszczalne w środowisku wodnym kompleksy inkluzyjne.

Cząsteczka substancji kompleksowanej ulega inkluzji do wnętrza cyklodekstryny, tworząc z nią kompleks typu „gość-gospodarz”, nie dochodzi jednak do powstawania wiązań kowalencyjnych. Cząsteczka „gościa” wnika do wnętrza „gospodarza” poprzez wyparcie cząsteczek wody, co powoduje obniżenie energii układu. W trakcie kompleksowania mają znaczenie takie czynniki jak: oddziaływania Van der Waalsa, wiązania wodorowe, zmiana napięcia powierzchniowego czy rozluźnienie szkieletu pierścienia [2, 4].

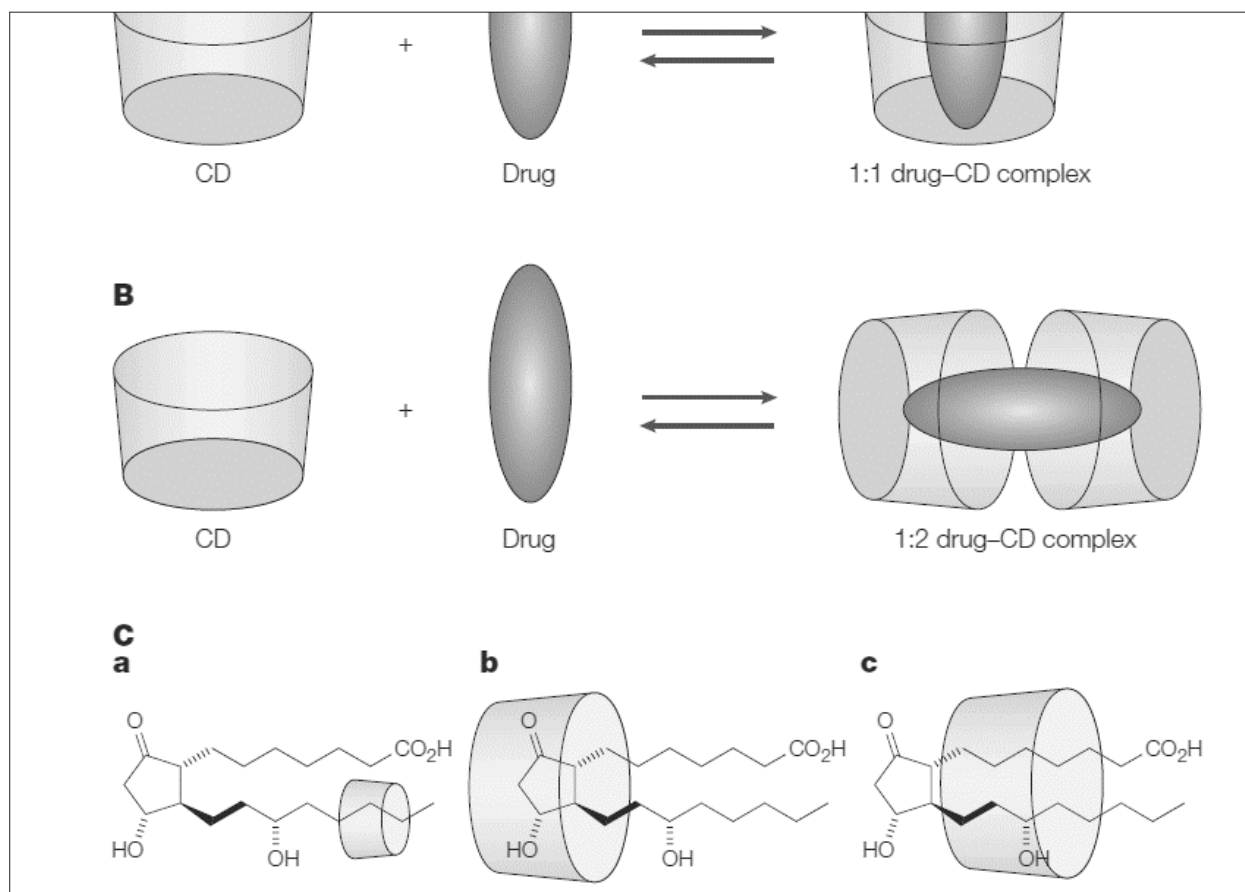
Ważne jest, aby mieć na uwadze, że proces tworzenia kompleksu inkluzyjnego i uwalniania substancji „gościa” z kompleksu jest dynamiczny. Okres półtrwania kompleksu jest znacznie krótszy niż jedna sekunda, co oznacza, że w roztworze substancja czynna jest naprzemiennie inkludowana i uwalniana z cyklodekstryny. W związku z tym kompleksowanie jest bardzo dynamicznym procesem i potwierdza, że oddziaływania pomiędzy „gościem” i „gospodarzem” nie mają charakteru wiązań kowalencyjnych [5, 6].

Ponadto kompleksy substancji czynnych z cyklodekstrynami, właśnie ze względu na brak wiązań kowalencyjnych, nie są traktowane jako nowe substancje czynne czy cząsteczki modyfikowane strukturalnie, cyklodekstryny bowiem rozpatrywane są w kategorii substancji pomocniczych dodawanych do formułacji [7].

Właściwości kompleksujące różnych cyklodekstryn zależą od rozmiaru ich pierścienia, jak również hydrofobowości powierzchni molekularnej wnętrza „gospodarza” [8]. Ze względu na rozmiar wnętrza α -cyklodekstryna kompleksuje alifatyczne łańcuchy,



Rycina 1. Struktura chemiczna naturalnych cyklodekstryn.



Rycina 2. Proponowane modele kompleksów inkluzyjnych pomiędzy prostaglandyną E2 a (a) α -cyklodekstryną, (b) β -cyklodekstryną i (c) γ -cyklodekstryną [1].

natomiast β -cyklodekstryna odpowiednia jest dla inkluzji cząsteczek zawierających pierścienie aromatyczne. Utworzenie kompleksu jest możliwe z całą cząsteczką „gościa” lub tylko z jej fragmentem (rycina 2) [1].

Zdolność cyklodekstryn do inkorporowania lub adsorbowania substancji czynnej daje możliwość stosowania ich jako substancji kompleksujących w celach zwiększenia rozpuszczalności w wodzie słabo rozpuszczalnych API, zwiększenia biodostępności API, zmniejszenia podrażnienia przewodu pokarmowego lub podrażnienia miejscowego wywołanego przez API, zmniejszenia lub wyeliminowania nieprzyjemnych zapachów lub smaków API oraz zapobiegania interakcji z innymi substancjami czynnymi i pomocniczymi [4, 9, 10].

Możliwość modyfikacji trwałości chemicznej aktywnych substancji labilnych z udziałem cyklodekstryn jest natomiast względnie nowym kierunkiem badań i aktualnie intensywnie rozwijanym. Dlatego też celem badań było wyznaczenie możliwości zastosowania cyklodekstryn jako substancji modyfikujących trwałość chemiczną labilnych substancji biologicznie czynnych, dla których udowodniono podatność na rozkład

pod wpływem czynników fizykochemicznych podczas hydrolizy kwasowo-zasadowej, termolizy, utleniania czy fotolizy [11]. W pracy zaplanowano także ocenę możliwości modyfikacji pozostałych właściwości fizykochemicznych badanych substancji biologicznie czynnych, istotnych z punktu widzenia zastosowań farmaceutycznych, takich jak: rozpuszczalności, szybkości rozpuszczania, przenikalności przez modelowe błony biologiczne oraz aktywności biologicznej.

Jako modelowe substancje do badań wybrano labilne substancje biologicznie czynne, wykazujące labilność pod wpływem różnych warunków fizykochemicznych (tj. w warunkach hydrolizy kwasowo-zasadowej oraz termolizy – meropenem, utleniania – cetyryzyna oraz fotolizy – rutyna).

Efekty oddziaływania modelowej substancji biologicznie czynnej (meropenemu) wrażliwej na rozkład w warunkach hydrolizy kwasowo-zasadowej oraz termolizy z β -cyklodekstryną

Meropenem jest analogiem β -laktamowym z grupy karbapenemów. Dzięki swojemu szerokiemu spektrum aktywności mikrobiologicznej znalazł

zastosowanie w farmakoterapii ciężkich zakażeń o etiologii bakteryjnej, wywołanych zarówno przez drobnoustroje Gram-dodatnie i Gram-ujemne [12]. Z racji obecności w swojej strukturze pierścienia β -laktamowego, meropenem jest nietrwały chemicznie zarówno w roztworach wodnych i w fazie stałej [13, 14]. Ze względu na znaczną nietrwałość chemiczną i niską biodostępność meropenemu uniemożliwiającą jego podawanie doustne, wymaga on podawania pozajelitowego.

W ramach wykonanych badań otrzymano metodą mieszania na sucho kompleks inkluzyjny meropenemu z β -cyklodekstryną w stosunku molowym 1:1. Wybór preparatyki układu meropenemu był podyktowany jego znaczną nietrwałością w kontakcie z wodą.

Stosując metody spektroskopowe (FT-IR, Raman), termiczne (DSC) oraz mikroskopowe (SEM), potwierdzono tożsamość kompleksu meropenem- β -cyklodekstryna. Analizę eksperymentalną, która potwierdziła obecność kompleksu inkluzyjnego, uzupełniono metodami teoretycznego modelowania molekularnego. Struktury molekularne izolowanych cząsteczek meropenemu oraz β -cyklodekstryny zoptymalizowano za pomocą metody opartej na teorii funkcjonału gęstości z potencjałem hybrydowym B3LYP przy bazie funkcyjnej 6-31G(d,p). Poznanie struktury kompleksu meropenem- β -cyklodekstryna zostało potwierdzone przez dokowanie meropenemu

do β -cyklodekstryny za pomocą oprogramowania AutoDockVina 1.1.2.

Przeprowadzone badania wykazały, że grupy: karbonylowa w grupie trans-hydroksyetylowej w pozycji C-6, grupa karboksylowa w pozycji C-2, a także grupa karbonylowa w C-7 w skondensowanym bicyklicznym pierścieniu meropenemu są bezpośrednio zaangażowane w oddziaływanie z cyklodekstryną.

Badania trwałości kompleksu meropenem- β -cyklodekstryna przeprowadzono w kwasie solnym ($c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $T = 303\text{--}333 \text{ K}$), roztworze wodorotlenku sodu ($c = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$, $T = 303\text{--}333 \text{ K}$) i w nadtlenku wodoru ($c = 1\text{--}4\%$, $T = 303 \text{ K}$) oraz w fazie stałej: w warunkach podwyższonej wilgotności względnej powietrza ($RH \sim 76\%$, $T = 313\text{--}343 \text{ K}$) oraz w suchym powietrzu ($RH = 0\%$, $T = 343\text{--}383 \text{ K}$) (Tabela 1). Inkluzja meropenemu do wnęki β -cyklodekstryny nie wpłynęła na zmianę kinetycznego mechanizmu rozkładu. Rozkład meropenemu, zarówno w formie wolnej jak i skompleksowanej, był zgodny z reakcją pseudo-pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Nie zaobserwowano również powstawania innych produktów rozkładu w przypadku formy skompleksowanej w porównaniu z rozkładem czystego meropenemu. We wszystkich przypadkach meropenem w formie skompleksowanej był statystycznie bardziej trwały od formy wolnej.

Tabela 1. Parametry kinetyczne i termodynamiczne rozkładu meropenemu [15].

Temp [K]	meropenem		meropenem-βCD		
	(k ±	Parametry termodynamiczne	(k ±	Parametry termodynamiczne	to
0.2 M HCl					
333 K	(2.02 ±	Ea = 55.09 ±	(1.86 ±	Ea = 55.16 ±	1.95
323 K					7.89
313 K					8.73
303 K					2.77
0.01 NaOH					
333 K	(5.90 ±	Ea = 26.94 ±	(5.58 ±	Ea = 35.64 ±	1.81
323 K					2.45
313 K					2.45
303 K					3.86
RH = 0%					
373 K	(5.65 ±	Ea = 79.49 ±	(5.81 ±	Ea = 81.37 ±	0.17
363 K					0.50
353 K					0.09
343 K					0.00
RH = 76.4%					
343 K	(8.20 ±	Ea = 67.72 ±	(5.41 ±	Ea = 66.77 ±	3.69
333 K					2.80
323 K					9.01
313 K					2.40

Meropenem charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością w wodzie. Inkluzja meropenemu do wnętrza β -cyklodekstryny tylko nieznacznie zwiększa jego rozpuszczalność (około 15%) [16]. Badania szybkości rozpuszczania zostały przeprowadzone w buforze fosforanowym (pH $\sim$ 7,2). Pomimo blokowania grup hydrofilowych w podstawniku trans-hydroksyetylowym i karboksylowym, w efekcie interakcji z β -cyklodekstryną, nie zaobserwowano zmniejszenia rozpuszczalności meropenemu.

Wyniki badań mikrobiologicznych, które miały na celu porównanie aktywności przeciwbakteryjnej meropenemu w formie wolnej i skompleksowanej wykazały, że kompleks meropenem- β -cyklodekstryna wykazywał większą siłę bakteriobójczą wobec *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus equi* i *Listeria ivanovii*. Jeśli chodzi o skuteczność przeciwbakteryjną w stosunku do pozostałych szczepów bakterii, wartości MIC były porównywalne dla wolnego meropenemu, jak i jego kompleksu inkluzyjnego [15].

Tworzenie kompleksu inkluzyjnego meropenemu z β -cyklodekstryną ma pozytywny wpływ na trwałość chemiczną meropenemu w warunkach hydrolizy kwasowo-zasadowej oraz podczas termolizy w fazie stałej, modyfikuje rozpuszczanie meropenemu w układzie z β -cyklodekstryną oraz wpływa korzystnie na profil działania przeciwbakteryjnego meropenemu (większa siła działania bakteriobójczego kompleksu inkluzyjnego wobec *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus equi* i *Listeria ivanovii*) [15, 17].

Efekty oddziaływania modelowej substancji biologicznie czynnej (cetyryzyny) wrażliwej na rozkład pod wpływem działania czynnika utleniającego z β -cyklodekstryną

Cetyryzyna jest lekiem przeciwhistaminowym, antagonistą receptora H_1 drugiej generacji i jest stosowana w leczeniu kataru siennego, alergii, obrzęku naczynioruchowego oraz pokrzywki. Doniesienia literaturowe traktują, że rozkład cetyryzyny w podczas utleniania przebiega zgodnie z reakcją pseudo-pierwszego rzędu względem stężenia substratu [18, 19].

Kompleks inkluzyjny cetyryzyny z β -cyklodekstryną został przygotowany metodą ugniatania w stosunku molowym 1:1, a jego tożsamość została potwierdzona metodami spektralnymi (FT-IR, Raman, XRPD) oraz termicznymi (DSC). Zmiany stężenia cetyryzyny podczas badań trwałości chemicznej, rozpuszczalności, szybkości rozpuszczania oraz przenikania przez model sztucznych błon (model PAMPA) zostały oznaczone wcześniej opracowaną metodą HILIC [20].

Strukturę chemiczną cetyryzyny można podzielić na trzy odrębne grupy: grupę fenyłową, grupę chlorofenyłową i grupę piperazyńoetoksyoctową. Dwie pierwsze grupy mają charakter hydrofobowy i mogą przyczyniać się do tworzenia kompleksów inkluzyjnych. Trzecia grupa ma charakter hydrofilowy i nie uczestniczy w interakcji z wnętrzem β -cyklodekstryny, ale adsorbuje na zewnętrznej stronie pierścienia cyklodekstryny. Analiza spektralna potwierdziła udział dwóch różnych domen w cząsteczce cetyryzyny, które zaangażowane są w interakcje z β -cyklodekstryną. W przypadku fizycznej mieszaniny nie zaobserwowano zmian.

Ze względu na podatność cetyryzyny na degradację w obecności czynnika utleniającego (H_2O_2) badano wpływ stężenia tego czynnika ($c=2-5\%$, $T=353\text{ K}$) na trwałość chemiczną cetyryzyny w postaci wolnej i po jej skompleksowaniu (Tabela 2). W celu zweryfikowania statystycznych różnic obserwowanych stałych szybkości rozkładu rozkładu cetyryzyny w formie wolnej i skompleksowanej zastosowano test równoległości. Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że wprowadzenie cetyryzyny do wnętrza cyklodekstryny nie zmieniało kinetycznego mechanizmu degradacji cetyryzyny. Rozkład cetyryzyny zarówno w formie wolnej, jak i skompleksowanej, przebiegał zgodnie z reakcją pseudo-pierwszego rzędu względem stężenia substratu. β -cyklodekstryna wywierała stabilizujący efekt na trwałość chemiczną cetyryzyny (na chromatogramach HPLC nie zaobserwowano pików pochodzących od utlenionego produktu degradacji) [21].

Rozpuszczalność cetyryzyny wzrastała liniowo w funkcji stężenia cyklodekstryny, co odpowiadało profilowi rozpuszczalności faz typu A zgodnie z modelem Higuchi i Connors [15]. Ponadto, na podstawie badań rozpuszczalności można zasugerować, że zwiększenie o 20% rozpuszczalności cetyryzyny (z $1,0\text{ mmol L}^{-1}$ do $1,2\text{ mmol L}^{-1}$) wynikało z jej inkluzji do wnętrza β -cyklodekstryny, jak również z adhezji solubilizujących cząsteczek cyklodekstryny do cetyryzyny dla domen pierścienia fenyłowego i chlorofenyłowego.

Badanie szybkości rozpuszczania cetyryzyny i jej kompleksu z β -cyklodekstryną przeprowadzono z zastosowaniem płynów akceptorowych: $0,1\text{ mol L}^{-1}$ kwas solny (pH 1,2) oraz bufor fosforanowy (pH 5,0–7,4). Analiza profili uwalniania wykazała, że cyklodekstryna znacznie zwiększyła szybkość rozpuszczania cetyryzyny. Cetyryzyna w efekcie wiązania w kompleksie inkluzyjnym szybciej się rozpuszczała i szybciej osiągała maksymalne stężenie. Zastosowana metoda po-

Tabela 2. Parametry kinetyczne rozkładu cetyryzyny [21].

Temp. [K]	H2O2 [%]	Cetyryzyna	Cetyryzyna-βCD	t0
		Parametry kinetyczne		
353 K	2%	$k (\Delta k = (7.51(0.68) \times 10^{-7} \text{ [s}^{-1}])$ $Sk = 1.01 \times 10^{-4}$ $r = 0.9965$ $n = 7$	$k (\Delta k = (5.77(0.61) \times 10^{-7} \text{ [s}^{-1}])$ $Sk = 8.98 \times 10^{-5}$ $r = 0.9954$ $n = 7$	4.64
353 K	3%	$k (\Delta k = (1.13(0.12) \times 10^{-6} \text{ [s}^{-1}])$ $Sk = 2.90 \times 10^{-4}$ $r = 0.9876$ $n = 7$	$k (\Delta k = (7.32(0.11) \times 10^{-7} \text{ [s}^{-1}])$ $Sk = 1.57 \times 10^{-4}$ $r = 0.9913$ $n = 7$	4.39
353 K	4%	$k (\Delta k = (1.36(0.15) \times 10^{-6} \text{ [s}^{-1}])$ $Sk = 2.18 \times 10^{-4}$ $r = 0.9951$ $n = 7$	$k (\Delta k = (9.86(0.18) \times 10^{-7} \text{ [s}^{-1}])$ $Sk = 2.62 \times 10^{-4}$ $r = 0.9866$ $n = 7$	4.02
353 K	5%	$k (\Delta k = (1.75(0.24) \times 10^{-6} \text{ [s}^{-1}])$ $Sk = 3.56 \times 10^{-4}$ $r = 0.9921$ $n = 7$	$k (\Delta k = (1.02(0.33) \times 10^{-6} \text{ [s}^{-1}])$ $Sk = 4.88 \times 10^{-4}$ $r = 0.9582$ $n = 7$	4.36

równania profili szybkości uwalniania potwierdziła, że zaobserwowane zmiany szybkości rozpuszczalności cetyryzyny były istotne statystycznie.

Zgodnie z klasyfikacją BCS, systemie opartym na różnicach rozpuszczalności i przepuszczalności, cetyryzyna należy do 3 klasy, której substancje charakteryzują się wysoką rozpuszczalnością i niską przenikalnością [22]. To właśnie hydrofilowa natura dichlorowodoru cetyryzyny może być łączona z niską przenikalnością przez błony biologiczne. Niezależnie od pH roztworów donorowych, cetyryzyna w formie skompleksowanej wykazywała statystycznie większą przepuszczalność w porównaniu do postaci wolnej.

Tworzenie kompleksu inkluzyjnego cetyryzyny zwiększa trwałość chemiczną cetyryzyny w warunkach utleniania, pozytywnie zwiększa rozpuszczanie i wpływa na dynamikę tego procesu. W konsekwencji zwiększa jej przenikanie przez błony biologiczne z cyklodekstrynowego układu na drodze dyfuzji biernej przez model symulujący warunki żołądkowo-jelitowe [21].

Efekty oddziaływania modelowej fotolabilnej substancji biologicznie czynnej (rutyny) z β-cyklodekstryną

Rutyna jest związkiem o budowie flawonoidowej, występującym w ziele *Ruta officinalis*. Z racji działania przeciwwzapalnego, przeciwdrobnoustrojowego, przeciwutleniającego oraz działania obniżającego poziom cholesterolu jest ona istotnym składnikiem wielu leków czy suplementów diety.

Kompleks inkluzyjny rutyna-β-cyklodekstryna otrzymano metodą ugniatania w stosunku molowym 1:1. Tworzenie kompleksu rutyna-β-cyklodekstryna techniką ugniatania potwierdzono za pomocą metod spektralnych (FT-IR i Ramana), termicznych (DSC) oraz mikroskopowych (SEM).

Analiza widm spektralnych kompleksu rutyna-β-cyklodekstryna pozwoliła na określenie domen w obrębie cząsteczki rutyny odpowiedzialnych za interakcję z nośnikiem. Możliwy mechanizm tworzenia kompleksu inkluzyjnego rutyna-β-cyklodekstryna zaproponowano za pomocą obliczeń teoretycznych. Zastosowanie modelowania molekularnego w celu określenia geometrii kompleksu inkluzyjnego rutyna-β-cyklodekstryna pozwoliło na określenie najbardziej możliwego sposobu inkluzji, określenie strukturalnej części związku rutyny, która oddziałuje w sposób niekwalencyjny z atomami wewnętrznej strony pierścienia β-cyklodekstryny oraz określenie względnej pozycji obu cząsteczek w kompleksie inkluzyjnym. Na podstawie analizy widm eksperymentalnych oraz obliczeń teoretycznych, określono, że podstawnik dihydroksyfenylowy w cząsteczce rutyny jest najbardziej zaangażowany w interakcje z β-cyklodekstryną.

Do oceny zmian stężenia rutyny w trakcie badań stabilności, rozpuszczalności, szybkości rozpuszczania i przenikania opracowano metodę UHPLC-DAD, która została zwalidowana zgodnie z wymogami ICH [23, 24].

Drugą częścią badań była analiza efektów modyfikacji właściwości fizykochemicznych rutyny, takich jak fototrwałość, rozpuszczalność, szybkość roz-

Tabela 3. Parametry kinetyczne i termodynamiczne rozkładu rutyny [25].

Temp., K	Rutyna		Rutyna-βCD		t0
	kobs, s-1	Parametry termodynamiczne	kobs, s-1	Parametry termodynamiczne	
0.5 mol/L HCl					
323	(2.75 ±	Ea = 122.97 ±	(1.86 ±	Ea = 114.90 ±	2.7754
333	(6.89 ±		(3.57 ±		9.4814
343	(2.47 ±		(2.25 ±		2.7754
353	(8.86 ±		(7.39 ±		4.3675
0.2 mol/L NaOH					
303	(1.81 ±	Ea = 75.26 ±	(1.81 ±	Ea = - 29.80 ±	0
308	(3.27 ±		(2.19 ±		4.4875
313	(4.99 ±		(4.08 ±		1.9454
318	(8.06 ±		(5.29 ±		1.9064
25% H2O2					
353	(1.62 ± 0.91) × 10-6	-	(1.11 (0.83) × 10-6	-	5.4930
Fotoliza					
-	(1.18 ± 0.91) × 10-6	-	(5.57 (0.54) × 10-7	-	5.9499

puszczania, przepuszczalność oraz aktywność przeciwnodkowa po jej wprowadzeniu do struktury β-cyklodekstryny [25].

Badania trwałości chemicznej roztworów kompleksów rutyna-β-cyklodekstryna zostały przeprowadzone w kwasie solnym ($c=0,5 \text{ mol L}^{-1}$), roztworze wodorotlenku sodu ($c=0,2 \text{ mol L}^{-1}$) i nadtlenu wodoru (25%). Natomiast rozkład rutyny w stanie stałym po inkludowaniu do struktury cyklodekstryny został przebadany po jej ekspozycji na światło ($1,2 \times 10^6 \text{ Lux h}^{-1}$) (Tabela 3). Inkluzja rutyny nie zmieniła kinetycznego mechanizmu degradacji rutyny, a rozkład był zgodny z reakcją pseudo-pierwszego rzędu względem stężenia substratu. Nie zaobserwowano również zmiany profilu produktów rozkładu rutyny. Trwałość rutyny w cyklodekstrynowym kompleksie była statystycznie większa w porównaniu do trwałości jej wolnej postaci.

Izoterma rozpuszczalności rutyny wzrastała w zależności od stężenia β-cyklodekstryny, przedstawiając typowy profil typu rozpuszczalności A_N zgodnie z modelem Higuchi i Connors [15]. Przy stężeniu $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ β-cyklodekstryny rozpuszczalność rutyny wzrosła z $1,00$ do $1,09 \text{ mmol L}^{-1}$, co stanowi nieznaczny wzrost rozpuszczalności rutyny. Dalszy wzrost stężenia β-cyklodekstryny nie powodował wzrostu rozpuszczania rutyny.

Badanie szybkości rozpuszczania przeprowadzono w płynie akceptorowym o pH ~ 7,2. Wzrost szybko-

ści rozpuszczania rutyny można łączyć ze wzrostem rozpuszczalności rutyny w wodzie, jako efekt inkluzji do wnętrza β-cyklodekstryny, chociaż jej uwalnianie było opóźnione w czasie.

Badania przenikania przez błony rutyny w postaci wolnej i skompleksowanej zostały przeprowadzone z zastosowaniem insertów pokrytych komórkami jelita grubego CaCo-2. Zaproponowany model do badań pozwolił na monitorowanie dyfuzji biernej rozpuszczanych cząsteczek rutyny. Wyniki pokazały 2-krotnie większy wzrost przenikania formy skompleksowanej rutyny przez błony biologiczne w porównaniu do postaci wolnej oraz wykluczyły możliwość udziału efektu *efflux* w przenikaniu kompleksu inkluzyjnego rutyny.

Badanie aktywności biologicznej, wyrażone badaniem aktywności antyoksydacyjnej, przeprowadzono w oparciu o wyznaczenie stężenia wolnych rodników w próbce rutyny oraz jej kompleksu inkluzyjnego po ekspozycji na światło ($1,2 \times 10^6 \text{ Lux h}^{-1}$). Stosując technikę EPR ustalono, że poziom wolnych rodników był niższy w przypadku formy skompleksowanej, co należy łączyć z większą wydajnością antyoksydacyjną kompleksu rutyny. Zbadano również proces zaniku wolnych rodników po napromieniowaniu próbek rutyny w postaci wolnej i po skompleksowaniu. Proces wygaszania wolnych rodników w funkcji czasu był bardziej intensywny w przypadku formy skompleksowanej rutyny.

Dodatkowo, w obszarze aktywności biologicznej rutyny badano jej działanie przeciwbakteryjne. Badania przeżywalności wzorcowych szczepów bakteryjnych wykazały, że kompleks rutyna- β -cyklodekstryna charakteryzuje się 2-krotnie wyższym działaniem przeciwko *Pseudomonas aeruginosa* i *Proteus vulgaris*.

Inkluzja rutyny do wnętrza β -cyklodekstryny wpływała pozytywnie na modyfikację fototrwałości rutyny, zwiększała jej rozpuszczalność oraz dynamikę tego procesu, wpływała na przenikanie na drodze dyfuzji biernej. Tworzenie kompleksu inkluzyjnego wpływało pozytywnie na aktywność biologiczną rutyny, poprzez wpływ na proces zaniku wolnych rodników po napromieniowaniu oraz poprawę aktywności przeciwbakteryjnej wobec wybranych szczepów bakteryjnych (2-krotnie wyższe działanie przeciwdrobnoustrojowe kompleksu inkluzyjnego przeciwko *Pseudomonas aeruginosa* i *Proteus vulgaris*) [25, 26].

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone badania wskazują na wielofunkcyjność cyklodekstryn w kontekście ich stosowania jako substancji pomocniczych, o możliwościach inkluzji aktywnych substancji biologicznych, z potencja-

łem stabilizacji chemicznej, modyfikacji rozpuszczania, przenikalności przez układy błon biologicznych oraz zmian właściwości biologicznych inkludowanych związków. Na przykładach modelowych związków aktywnych biologicznie wykazujących rozkład w warunkach hydrolizy kwasowo-zasadowej i termolizy (meropenem), utleniania (cetyryzyna) i fotolizy (rutyna) wykazano korzystne zmiany istotnych parametrów fizykochemicznych po ich wprowadzeniu do cyklodekstrynowych układów.

PODZIĘKOWANIA

Wyniki badań były częścią „Pracy naukowej finansowanej ze środków budżetowych na naukę w latach 2013-2016 jako projekt badawczy w ramach programu pod nazwą „Diamantowy Grant” (DI2012 024342)”, „Badań finansowanych ze środków Narodowego Centrum Nauki (Preludium, 2015/17/N/NZ7/00937)”, „Praca powstała dzięki grantowi naukowemu Naukowej Fundacji Polpharmy” oraz „Autor uzyskał środki finansowe na przygotowanie rozprawy doktorskiej z Narodowego Centrum Nauki w ramach finansowania stypendium doktorskiego na podstawie decyzji numer DEC-2017/24/T/NZ7/00174”.

PIŚMIENNICTWO

1. Davis M.E., Brewster M.E.: Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews*, 2004; 3: 1023-1035.
2. Loftsson T., Brewster M.E.: Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. *J Pharm Pharmacol*, 2010; 62: 1607-1621.
3. Loftsson T., Brewster M.E.: Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci*, 1996; 85: 1017-1025.
4. Brewster M.E., Loftsson T.: Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007; 59: 645-666.
5. Del Valle M.E.M.: Cyclodextrin and their uses: a review. *Process Biochem*, 2004; 39(9): 1033-1046.
6. Stella V.J., Rajewski R.A.: Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharm Res*, 1997; 14: 556-567.
7. Swarbrick J. (red.): Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Vol 2, Mosher G, Thompson D.O.: Complexation: cyclodextrins. *Informa Healthcare*, 2007; 671-695.
8. Viernstein H., Köhler G., Wolschann P.: Influence of the ring shape of different cyclodextrins on complexation properties. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 1996; 25(1-3): 129-132.
9. Tiwari G., Tiwari R., Rai A.K.: Cyclodextrins in delivery systems: Applications. *J Pharm Bioallied Sci*, 2010; 2(2): 72-79.
10. Arima H., Higashi T., Motoyama K.: Improvement of the bitter taste of drugs by complexation with cyclodextrins: applications, evaluations and mechanisms. *Ther Deliv*, 2012; 3(5): 633-644.
11. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2), ICH (International Conference on Harmonisation) Harmonised Tripartite Guideline; 2003.
12. Paczkowska M., Garbacki P., Zalewski P., et al.: Meropenem – rekomendacje terapeutyczne po 20 latach obecności na rynku farmaceutycznym. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2014; 68: 441-445.
13. Mendez A., Dalomo J., Steppe M., et al.: Stability and degradation kinetics of meropenem in powder for injection and reconstituted sample. *J Pharm Biomed Anal*, 2006; 41(4): 1363-1366.
14. Mendez A., Chagastelles P., Palma E., et al.: Thermal and alkaline stability of meropenem: degradation products and cytotoxicity. *Int J Pharm*, 2008; 350(1-2): 95-102.
15. Paczkowska M., Mizera M., Szymanowska-Połańska D., et al.: β -cyclodextrin complexation as an effective drug delivery system for meropenem. *Eur J Pharm Biopharm*,

- 2016; 99: 24-34.
16. Higuchi T, Connors KA: Phase-solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, 1965; 4: 117-212.
17. Cielecka-Piontek J., Paczkowska M., Lewandowska K., et al.: Solid-state stability study of meropenem – solutions based on spectrophotometric analysis. *Chem Cent J*, 2013; 7: 98.
18. Sourì E., Hatami A., Ravari N.S., et al.: Validating a Stability Indicating HPLC Method for Kinetic Study of Cetirizine Degradation in Acidic and Oxidative Conditions. *Iran J Pharm Res*, 2013; 12(2): 287-294.
19. Dyakonov T., Muir A., Nasri H., et al.: Isolation and characterization of cetirizine degradation product: mechanism of cetirizine oxidation. *Pharm Res*, 2010; 27: 1318-1324.
20. Paczkowska M., Mizera M., Tezyk A., et al.: Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) for the determination of cetirizine dihydrochloride. *Arab J Chem*, 2016, <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.05.012>.
21. Paczkowska M., Mizera M., Lewandowska K., et al.: Effects of inclusion of cetirizine hydrochloride in β -cyclodextrin. *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, 2018; 91: 149-159.
22. Wu C.Y., Benet L.Z.: Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharm Res*, 2005; 22(1): 11-23.
23. Validation of analytical procedures Q2(R1), ICH (International Conference on Harmonisation) Harmonised Tripartite Guideline; 1996.
24. Paczkowska M., Zalewski P., Krause A., et al.: Kinetic of Rutin Degradation and its Determination in Dietary Supplements. *Curr Pharm Anal*, 2017; 13(2): 123-130.
25. Paczkowska M., Mizera M., Piotrowska H., et al.: Complex of rutin with β -cyclodextrin as potential delivery system. *PLoS ONE*, 2015; 10(3), doi: 10.1371/journal.pone.0120858.
26. Paczkowska M., Lewandowska K., Bednarski W., et al.: Application of spectroscopic methods for identification and determination of quercetin-3-O-rutinoside. Experimental and DFT based approach. *Spectrochim Acta A*, 2015; 140: 132-139.

Potencjał terapeutyczny ceragenin oraz nanosystemów zawierających substancje aktywne błonowo w terapii chorób nowotworowych

Therapeutic potential of ceragenins and nanosystems containing membrane active compounds in the anti-cancer therapies

Ewelina Piktel,
Robert Bucki

¹ Samodzielna Pracownia Techniki Mikrobiologicznych i Nanobiomedycznych, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Mickiewicza 2C, 15-222 Białystok, Polska

Finansowanie: Badania zawarte w niniejszej pracy były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu PRELUDIUM pt. „Immunomodulujące właściwości nanosystemów zawierających substancje aktywne błonowo oraz ich potencjał w terapii nowotworów lekoopornych” UMO-2015/19/N/NZ6/01872 (kierownik projektu: dr n. med. Ewelina Piktel). Środki finansowe na przygotowanie rozprawy doktorskiej zostały również przyznane w ramach programu stypendialnego Naukowej Fundacji Polpharmy.

Streszczenie

Stale wzrastająca zachorowalność na choroby nowotworowe, wysoka śmiertelność z ich powodu, złożona immunopatogeneza nowotworów oraz niejednorodny stopień nasilenia i rozwoju choroby, wymuszają stałe poszukiwanie nowych czynników o aktywności przeciwnowotworowej. Pomimo ciągłego rozwoju nowych metod diagnostyczno-terapeutycznych, mających zastosowanie w terapii chorób nowotworowych, istotnym problemem nadal pozostaje niska specyficzność cytostatyków, ich wysoka toksyczność, a także stale pogłębiające się zjawisko oporności wielolekowej nowotworów. Aktualnie coraz większe nadzieje aplikacyjne wiąże się z zastosowaniem naturalnych, kationowych peptydów przeciwbakteryjnych (PPB) oraz ich syntetycznych, lipidowych analogów z grupy ceragenin (CSA) jako potencjalnych czynników leczniczych. Ich szczególne cechy, obejmujące błonowy mechanizm działania, selektywność w stosunku do komórek nowotworowych, biokompatybilność oraz brak odnotowanego mechanizmu oporności w stosunku do tej grupy związków sprawiają, iż kationowe peptydy przeciwnowotworowe są prezentowane jako skuteczna alternatywa dla współcześnie stosowanych cytostatyków. Szereg doniesień literaturowych potwierdza również możliwość zastosowania nanocząstek magnetycznych jako wysoce efektywnych i biokompatybilnych nośników leków, zapewniających osiągnięcie odpowiednio wysokiego stężenia wewnątrzkomórkowego leku i tym samym zwiększających jego aktywność przeciwnowotworową. Dotychczas uzyskane wyniki badań wskazują na możliwość stworzenia nowych form terapii przeciwnowotworowej opartej o nanosystemy o aktywności błonowej. Koniecznym jednak jest przeprowadzenie dodatkowych analiz określających bezpieczeństwo stosowania proponowanych nanosystemów, a także oceniających ich potencjał aplikacyjny w obrazowaniu MRI oraz terapii hipertermalnej guzów nowotworowych.

Słowa kluczowe: peptydy przeciwbakteryjne, cerageniny, ludzka katelicydyna, nowotwory, nanotechnologia

Wpłynęło: 28-03-2019
Zaakceptowano: 10-05-2019
Opublikowano: 20-05-2019

Adres do korespondencji
prof. dr hab. Robert Bucki
Samodzielna Pracownia
Techniki Mikrobiologicznych
i Nanobiomedycznych, Uniwersytet
Medyczny w Białymstoku,
Mickiewicza 2C, 15-222 Białystok
tel.: +48 (85) 748 54 83; e-mail:
bucki robert@gmail.com

Abstract

Constantly increasing morbidity and mortality of cancer, complex immunopathogenesis of tumors and variable development and severity of the disease, enforce a constant search for new therapeutic factors with anti-cancer activity. Despite the constant achievements in anti-cancer diagnostic and therapeutic methods development, the low specificity and high toxicity of cytostatics, and the multidrug resistance expansion, still remain a considerable health problem. Currently, natural, cationic antimicrobial peptides (AMPs) and their synthetic lipid analogs from the ceragenin group (CSA) are presented as potential antineoplastic compounds. Their special features, including the membrane permeabilizing-based mechanism of action, selectivity towards tumor cells, biocompatibility and the absence of a recorded anti-AMPs resistance mechanism, make cationic antineoplastic peptides an effective alternative to modern cytostatics. Moreover, a compelling number of research confirm the possibility of using magnetic nanoparticles as highly effective and biocompatible drug carriers, ensuring the achievement of a sufficiently high intracellular concentration of drug and thus, increasing its antineoplastic activity. The results obtained so far indicate the possibility of the employment of natural AMPs and their synthetic analogs from ceragenins group in an effective eradication of cancer cells. Nevertheless, further studies aiming to elucidate the safety of proposed nanosystems and focused on the employment of ceragenin-based nanosystems in diagnostic MRI imaging and as hyperthermia inducers are needed and justified.

Keywords: antimicrobial peptides, ceragenins, human cathelicidin, cancer, nanotechnology

WPROWADZENIE

Oporność komórek nowotworowych, zarówno w stosunku do leków cytostatycznych, jak i leków ukierunkowanych molekularnie, istotnie ogranicza możliwości lecznicze i stanowi jedną z najważniejszych przyczyn niepowodzenia terapii. Pomimo gwałtownego rozwoju nowych metod diagnostyczno-terapeutycznych, nowotwory odporne na leczenie nadal dotyczą znaczącego odsetka osób objętych terapią. Szacuje się, iż zmniejszona wrażliwość nowotworów na stosowane leczenie cytostatyczne, zarówno pierwotna, jak i nabyta podczas leczenia, dotyczy nawet 40% przypadków klinicznych, co drastycznie zmniejsza efektywność terapeutyczną substancji leczniczych i istotnie zwiększa prawdopodobieństwo wznowy choroby i śmierci (1, 2). Obecnie wiadomo, iż oporność na chemioterapeutyki jest procesem wieloczynnikowym, a heterogenność guzów nowotworowych i ich złożona immunopatofizjologia istotnie utrudniają stworzenie leków o uniwersalnym, przeciwnowotworowym mechanizmie działania (3). Spośród czynników farmakologicznych

największy wpływ na rozwój lekooporności wydają się mieć: nieprawidłowe dawkowanie, zmiany w dostępności biologicznej cytostatyku oraz zmiany na poziomie metabolizmu (4). Na poziomie komórkowym, wśród licznych mechanizmów oporności lekowej (5), obejmujących (i) zmiany ekspresji białek docelowych, (ii) intensyfikację procesów naprawczych DNA, (iii) ograniczoną aktywację lub wzmożoną inaktywację leku w komórkach docelowych, (iv) zmiany metabolizmu komórkowego, (v) zmiany epigenetyczne bądź (v) zahamowanie procesów apoptozy, niezwykle istotną klinicznie jest nadekspresja białek z rodziny ABC (ang. *ATP-binding cassette*) (6). Rodzina ta skupia białka, mające charakter transporterów przezbłonowych, posiadające domenę wiążącą ATP – energia uwalniania w trakcie hydrolizy ATP do adenozyno-di-fosforanu (ADP) jest wykorzystywana do nieswoistego i aktywnego transportu cząsteczek różniących się istotnie budową strukturalną (7). Pomimo iż w warunkach fizjologicznych wykazują one działanie protekcyjne, chroniąc komórki przed toksycznym wpływem ksenobiotyków oraz endogennych metabolitów oraz warunkując prawidłowo-

we funkcjonowanie licznych barier tkankowych (8), ich nadmierna ekspresja na powierzchni komórek nowotworowych uważana jest za główną przyczynę występowania oporności wielolekowej (ang. *multi-drug resistance*, MDR), definiowanej jako równoczesną niewrażliwość komórek rakowych na kilka typów cytostatyków niewykazujących strukturalnego podobieństwa oraz charakteryzujących się różnymi molekularnymi punktami uchwytu, w odpowiedzi na stosowanie pojedynczej substancji cytotoksycznej (7). Do chwili obecnej wyizolowano i zidentyfikowano 49 białek zaliczanych do grupy transporterów ABC. Równocześnie wśród nich największe znaczenie kliniczne przypisuje się trzem białkom: glikoproteinie P (P-gp, ABCB1), białku oporności wielolekowej 1 (MRP1/ABCC1, ang. *multidrug resistance protein 1*) oraz białku BCRP (ABCG2/MXR/ABCP, ang. *breast cancer resistant protein*) (7), które aktywnie usuwają cząsteczki chemioterapeutyku z wnętrza komórki, obniżając tym samym jego wewnątrzkomórkowe stężenie (tzw. efluks komórkowy) i uniemożliwiając osiągnięcie odpowiedniego efektu leczniczego (9). Szacuje się, iż ponad 50% współcześnie stosowanych leków przeciwnowotworowych, w tym: paklitaksel, cisplatyna, dokсорubicyna, winkrystyna, gemcytabina oraz SN-38, jest przenoszonych przy udziale tych transporterów (10). W ostatnich latach podejmowano liczne próby ograniczenia zjawiska oporności wielolekowej związanej z nadekspresją transporterów z rodziny ABC. Mimo różnorodności potencjalnych czynników terapeutycznych, stosowanych w celu blokady bądź inaktywacji transporterów z rodziny ABC i tym samym zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia leków przeciwnowotworowych, nadal nie ograniczono tego zjawiska do stopnia umożliwiającego prowadzenie skutecznej chemioterapii systemowej. Ze względu na kumulację efektów toksycznych nie powiodły się próby wprowadzenia terapii kombinowanej wykorzystującej lek cytotoksyczny w skojarzeniu z inhibitorami białek ABC (11). Obiecujące wyniki badań w modelach eksperymentalnych, wykazujące znaczną aktywność oraz niską toksyczność licznych modulatorów transporterów ABC, nie znalazły potwierdzenia w badaniach klinicznych, głównie ze względu na ich niską selektywność oraz liczne działania niepożądane (10). Aktualnie znaczne nadzieje aplikacyjne wiąże się z zastosowaniem drobnocząsteczkowych inhibitorów kinaz oraz inhibitorów fosfodiesterazy 5, jednak pełna ocena ich skuteczności oraz bezpieczeństwa stosowania wymaga dodatkowych badań (9-11). Jedną z nowszych strategii terapeutycznych zakłada wykorzystanie nanomateriałów, jako wysoce skutecznych i biokompatybilnych nośników leków, przy udziale których możliwym byłby wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia leków przeciwnowo-

tworowych, wzrost ich efektywności terapeutycznej i tym samym zniesienie lekooporności komórek nowotworowych (12). Szereg doniesień literaturowych wskazuje również na możliwość zastosowania w tym względzie związków o aktywności błonowej, w tym naturalnych peptydów przeciwbakteryjnych (ang. *antimicrobial peptides*, AMPs) oraz ich syntetycznych analogów, charakteryzujących się wielokierunkowym działaniem biologicznym. Postuluje się, iż dzięki kooperacji szczególnych cech fizykochemicznych nanomateriałów oraz niespecyficznego, błonowego mechanizmu działania naturalnych peptydów przeciwbakteryjnych możliwe jest stworzenie wieloczynnikowej platformy, przy wykorzystaniu której możliwe będzie osiągnięcie odpowiedniego efektu terapeutycznego i zapewnienie całkowitej remisji choroby, przy równoczesnym ograniczeniu działań niepożądanych, towarzyszących chemioterapii systemowej oraz zmniejszeniu lekooporności komórek rakowych.

Naturalne peptydy przeciwbakteryjne i ich syntetyczne analogi – cerageniny jako alternatywa dla współcześnie stosowanych cytostatyków

Niska selektywność współcześnie stosowanych cytostatyków, ich wysoka toksyczność, stale narastające zjawisko lekooporności komórek nowotworowych oraz wysoka zmienność patofizjologiczna nowotworów wymuszają poszukiwanie związków o (i) alternatywnych, uniwersalnych mechanizmach działania, (ii) niskim potencjale do indukcji oporności, (iii) wysoce selektywnych w stosunku do komórek nowotworowych i tym samym (iv) charakteryzujących się wysoką biokompatybilnością. W tym aspekcie obiecującym kierunkiem badań wydaje się zastosowanie naturalnych peptydów przeciwbakteryjnych oraz ich syntetycznych, lipidowych analogów z grupy ceragenin (CSA, ang. *cationic steroid antibiotics*) jako nowych leków przeciwnowotworowych.

Rozwój oporności lekowej mikroorganizmów i pojawienie się wielolekoopornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oraz *Enterococcus faecium* wymusiło poszukiwanie nowych leków przeciwbakteryjnych skutecznych w leczeniu zakażeń lekoopornymi drobnoustrojami. Endogenne peptydy przeciwdrobnoustrojowe dzięki swojej aktywności przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej, przeciwwirusowej oraz przeciwprwotniaczej są kluczowymi efektorami wrodzonej odporności organizmów żywych (13). Istotnym jest, iż peptydy te, oprócz szerokiego spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, wykazują również znaczną aktywność immunomodulującą oraz zdolność do neutralizacji endotoksyn bakteryjnych. Wywierają również

istotny wpływ na procesy angiogenezy oraz stymulują procesy gojenia ran, co uwarunkowane jest ich zróżnicowanym wpływem na receptory błonowe i wewnątrzkomórkowe (14). Potencjał aplikacyjny tych związków oraz ich wielokierunkowe działanie podkreślają doniesienia o protekcyjnym wpływie PPB przeciwko uszkodzeniu zakażonych tkanek, co możliwe jest dzięki blokowaniu enzymów proteolitycznych wydzielanych przez mikroorganizmy (15). Pomimo różnorodności strukturalnej i funkcjonalnej, naturalne peptydy przeciwbakteryjne wykazują liczne cechy wspólne, włączając w to: (i) stosunkowo prostą budowę (najczęściej zbudowane są z sekwencji 15-50 aminokwasów), (ii) występowanie w organizmie jako propetydy, ulegające aktywacji w procesie proteolizy, (iii) amfipatyczny charakter chemiczny umożliwiający interakcję z błonami lipidowymi komórek mikroorganizmów oraz (iv) fakt, iż wydzielane są w sposób ciągły lub/ oraz w odpowiedzi na drażniące działanie czynników chemicznych, mechanicznych, oraz mikrobiologicznych. W aspekcie wykorzystania naturalnych peptydów przeciwbakteryjnych w nowoczesnej terapii onkologicznej najbardziej istotny wydaje się jednak kationowy charakter wielu PPB, włączając w to pochodzący z ludzkiej katelicydiny peptyd LL-37 (16). Badania przeprowadzone na szczepach bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych jednoznacznie potwierdziły, iż aktywność bakteriobójcza peptydu LL-37 oraz innych peptydów przeciwdrobnoustrojowych uwarunkowana jest ich znaczną aktywnością błonową. Wykazano, iż peptydy te niszczą komórki patogenne poprzez dezintegrację błony komórkowej lub błony mitochondrialnej, co uwarunkowane jest elektrostatycznym oddziaływaniem kationowego peptydu z ujemnie naładowaną powierzchnią błony komórkowej mikroorganizmu, prowadząc w następstwie do powstawania porów w błonie komórkowej, utraty zdolności regulacji potencjału błonowego i ostatecznie do rozpadu bakterii (17). Aktualnie, podejmowane są próby wykorzystania analogicznego, błonowego mechanizmu działania w zwalczaniu komórek nowotworowych.

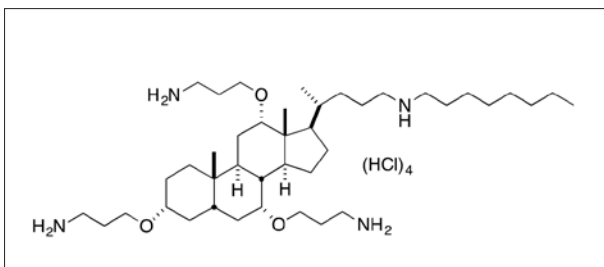
Stale wzrastająca ilość doniesień literaturowych wskazuje na istotne podobieństwa w budowie strukturalnej oraz charakterze fizykochemicznym błon biologicznych bakterii i komórek nowotworowych. Wykazano, iż błona komórek nowotworowych, w przeciwieństwie do błon komórek niepoddanych transformacji nowotworowej, charakteryzuje się znaczną kumulacją powierzchniowego ładunku ujemnego, co uwarunkowane jest obecnością znacznych ilości kwasu sjałowego (18), O-glikolizowanej mucyny (19), siarczanu heparyny (20) oraz siarczanu chondroityny (21), a także in-

korporacją fosfatydyloseryny do zewnętrznej monowarstwy fosfolipidowej błony komórkowej (22). Sugeruje się, iż zwiększenie gęstości ładunku ujemnego na powierzchni komórek nowotworowych jest czynnikiem warunkującym zmniejszone przyleganie komórek rakowych do błony podstawnej bogatej w kwas hialuronowy, co z kolei ułatwia przerzutowanie nowotworów. Równocześnie zjawisko to potencjalnie ułatwia interakcję naturalnych peptydów przeciwbakteryjnych z komórkami rakowymi i umożliwia relatywną selektywność tej grupy związków (18). Wśród innych czynników sprzyjających interakcji PPB z komórkami rakowymi, zwiększających jednocześnie efekt lityczny kationowych peptydów w stosunku do komórek rakowych, wyróżnia się: (i) zwiększenie płynności komórek nowotworowych na skutek mniejszej zawartości cholesterolu w błonach komórkowych (23-25) oraz (ii) większą powierzchnię komórek ze względu na dużą liczbę kosmków komórkowych (26). Nie bez znaczenia jest również zdolność kationowych peptydów do interakcji z błoną komórkową mitochondriów komórkowych (w analogi do zewnątrzkomórkowego, błonowego mechanizmu działania) i tym samym zaburzeń potencjału mitochondrialnego i aktywacji kaspazozależnej apoptozy (27). Sugeruje się, że właściwe wykorzystanie różnic w budowie błon biologicznych komórek rakowych oraz komórek zdrowych, niepoddanych transformacji nowotworowej, a także odpowiednie zastosowanie molekularnych mechanizmów działania endogennych peptydów przeciwdrobnoustrojowych może przyczynić się do skutecznej terapii chorób nowotworowych, włączając w to nowotwory odporne na konwencjonalne leczenie chemioterapeutyczne. Dotychczas znaczna aktywność przeciwnowotworowa została opisana dla szeregu endogennych peptydów przeciwbakteryjnych, włączając w to peptyd LL-37 (28), mellitynę (29), laktoferrycynę B (30) oraz defensynę 2 (31). Obecnie coraz większe nadzieje aplikacyjne wiąże się z zastosowaniem analogów syntetycznych, charakteryzujących się lepszymi parametrami farmakokinetycznymi oraz wyższą skutecznością terapeutyczną.

Pomimo wysoce korzystnych cech endogennych peptydów przeciwbakteryjnych, takich jak: (i) niespecyficzny gatunkowo mechanizm działania bójczego, (ii) niska tendencja do wywoływania lekooporności oraz (iii) wielokierunkowe działanie biologiczne, obejmujące aktywność immunomodulującą oraz zdolność do stymulacji regeneracji ran, stale podejmowane są próby syntezy niepeptydowych analogów PPB, które charakteryzowałyby się wyższą opornością na czynniki proteolityczne, lepszą biodostępnością po podaniu doustnym, wyso-

ką aktywnością biologiczną w płynach ustrojowych oraz niższymi kosztami syntezy. Ostatnie doniesienia wskazują, iż odpowiedzią na te problemy może być zastosowanie ceragenin, będących lipidowymi analogami endogennych peptydów przeciwdrobnoustrojowych.

Cerageniny, będące pochodnymi kwasu cholowego (Rycina 1), pomimo swojej niepeptydowej budowy, wykazują liczne podobieństwa strukturalne do endogennych peptydów przeciwbakteryjnych. Podobnie jak PPB, wykazują one ładunki dodatnie rozmieszczone po jednej stronie oraz reszty hydrofobowe po drugiej, co zapewnia im amfipatyczny charakter chemiczny i umożliwia interakcję z błoną komórkową patogenów (32). Aktualnie uważa się, iż dzięki zdolności do insercji w strukturę lipidową błony mikroorganizmów i tym samym, zaburzania jej funkcji, cerageniny oferują nowe możliwości w leczeniu infekcji bakteryjnych i grzybiczych, a szereg doniesień literaturowych wskazuje na szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej tej grupy związków, zarówno w stosunku do patogenów bakteryjnych (33-35), grzybiczych (36, 37), pierwotniaków (38) oraz wirusów (39).



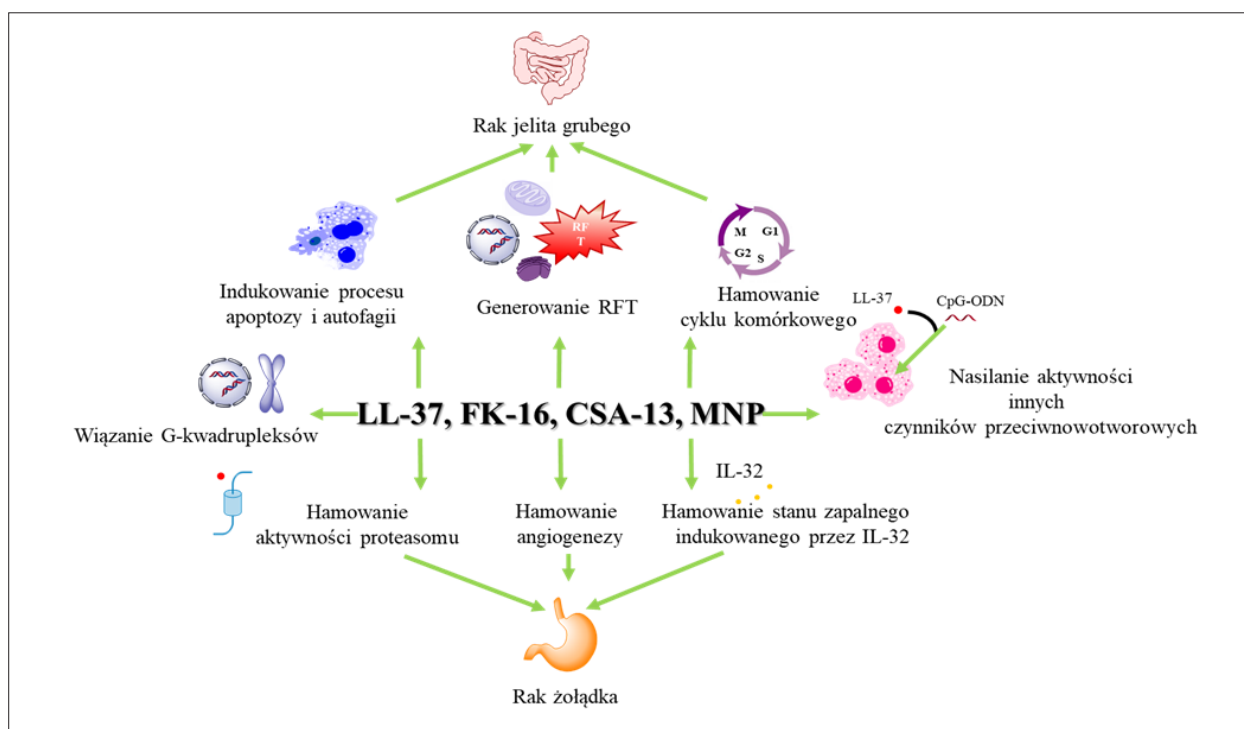
Rycina 1. Struktura chemiczna cerageniny CSA-13. Cerageniny, w analogii do endogennych peptydów przeciwbakteryjnych, posiadają część hydrofobową (pierścień steroidowy) oraz część hydrofilową, co nadaje im amfipatyczny charakter chemiczny i umożliwia interakcję z błoną lipidową mikroorganizmów oraz komórek nowotworowych.

Dotychczasowe badania przeprowadzone na szczepach komórek bakteryjnych i grzybiczych stanowią istotną bazę dla rozważań na temat potencjalnego zastosowania związków o aktywności błonowej w nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej. Sugeruje się, iż endogenne peptydy przeciwbakteryjne, a w szczególności cerageniny, oddziałują z błonami komórek nowotworowych w sposób analogiczny jak ma to miejsce w przypadku komórek mikroorganizmów, co potencjalnie umożliwia ich zastosowanie w skutecznej terapii zarówno guzów litych, jak i nowotworów krwi (28, 40).

Szereg analiz wykorzystujących linie komórkowe pochodzące z nowotworów o największych zna-

czeniu klinicznym wyraźnie wskazuje, iż pochodzący z ludzkiej katelicydyny peptyd LL-37 w sposób znamieny ogranicza proliferację i zmniejsza inwazyjność komórek raka żołądka (41, 42), raka jelita grubego (28, 43, 44) oraz nowotworów hematologicznych (45). Szczegółowa analiza mechanizmu działania wykazała, że aktywność przeciwnowotworową wykazuje zarówno peptyd LL-37, jak i jego pochodne – peptyd FK-16 (o sekwencji aminokwasowej LL-37 w pozycjach 17-32) oraz peptyd FF/CAP (otrzymany poprzez substytucję kwasu glutaminowego i lizyny fenyloalaniną) (28, 43, 44) – co uwarunkowane jest (i) indukcją procesów apoptozy niezależnych od szlaku kaspaz, (ii) nasileniem ekspresji PUMA, (iii) stymulacją procesów autofagii, (iv) zahamowaniem aktywności proteasomu w tkankach nowotworowych, a także (v) ograniczeniem procesów angiogenezy poprzez wpływ na receptory FPRL-1 (41, 43, 44) (Rycina 2). Równocześnie jednak wykazano, iż peptyd LL-37 uważany jest za negatywny czynnik prognostyczny w przypadku raka jajnika (46-48), raka piersi (49), raka prostaty (50) oraz czerniaka (51), a za główny molekularny mechanizm pronowotworowego wpływu ludzkiej katelicydyny uważana jest stymulacja receptorów z rodziny EGFR, IGR-1R and ERB, regulujących proliferację komórkową (49, 52, 53). Powyższe badania wyraźnie sugerują, iż ze względu na zdolność peptydu LL-37 do stymulacji szerokiej gamy receptorów błonowych oraz czynników wewnątrzkomórkowych, określenie dokładnej roli tego czynnika w rozwoju nowotworów jest nadal utrudnione i wymaga uwzględnienia dodatkowych właściwości ludzkiej katelicydyny, włączając w to stymulację gojenia ran, wpływ na procesy angiogenezy czy też właściwości przeciwzapalne (14, 16).

Ilość badań na temat przeciwnowotworowego działania ceragenin, w tym najlepiej scharakteryzowanej cerageniny CSA-13, jest nadal ograniczona w stosunku do liczby doniesień opisujących potencjał przeciwnowotworowy endogennych peptydów przeciwbakteryjnych. Jedne z pierwszych badań opisujących potencjał terapeutyczny CSA-13 w stosunku do nowotworu raka jelita grubego wskazało, iż mechanizm jego przeciwnowotworowego działania obejmuje zmiany w architekturze błony biologicznej komórek rakowych, a w następstwie zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G1/S oraz indukcję apoptozy w mechanizmie niezależnym od kaspaz oraz aktywności białka p53 (54). Późniejsze analizy przeprowadzone przez nasz zespół badawczy, a przeprowadzone przy użyciu komórek raka jelita grubego linii DLD-1 oraz HT-29 inkubowanych w obecności CSA-13 oraz LL-37, potwierdziły znaczny potencjał aplikacyjnych tej grupy związków (55).



Rycina 2. Wielokierunkowy mechanizm przeciwnowotworowego działania substancji o aktywności błonowej oraz magnetycznych nanocząstek na bazie tlenku żelaza w stosunku do komórek raka jelita grubego oraz raka żołądka.

Obiecujące wyniki, uzyskane przy wykorzystaniu komórek raka jelita grubego, skłoniły do dalszej analizy możliwości terapeutycznych związków o aktywności błonowej z grupy ceragenin. Co interesujące, analizy oceniające przydatność terapeutyczną cerageniny CSA-13 w stosunku do komórek raka piersi MCF7 (ATCC® HTB-22™) oraz MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) pozwoliły na odnotowanie nowego, nieopisanego do tej pory, mechanizmu aktywności przeciwnowotworowej tego związku, który związany jest z zaburzeniem równowagi oksydoredukcyjnej komórki rakowej i tym samym, indukcją apoptozy w komórkach nowotworowych traktowanych CSA-13 (40). Ceragenina CSA-13, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami na temat przeciwbakteryjnej aktywności tego związku (55, 56), wykazywała się istotnie wyższą aktywnością niż peptyd LL-37, w szczególności w stosunku do komórek linii raka piersi potrójnie negatywnego (MDA-MB-231; ER(-)/PR(-)/HER2(-)). W dalszych etapach badań, za pomocą cytometrii przepływowej oraz mikroskopii konfokalnej wykazano, iż inkubacja komórek rakowych w obecności cerageniny CSA-13 skutkuje w pierwszym etapie obniżeniem wewnątrzkomórkowego poziomu glutationu, a w kolejnych – nadprodukcją reaktywnych form tlenu, indukcją stresu oksydacyjnego, zwiększeniem przepuszczalności błon mitochondrialnych, depolaryzacją błony mitochondriów oraz aktywacją kaspaz, co jest bezpośrednią przyczyną inicjacji procesu apoptozy w komórkach raka piersi (40).

Zaprezentowane wyniki wskazują na znaczny potencjał aplikacyjny CSA-13 (i potencjalnie innych ceragenin) w terapii chorób nowotworowych i uzasadniają prowadzenie dalszych badań w tym obszarze. Sugeruje się, aby podczas dalszych analiz uwzględnić nie tylko aktywność terapeutyczną samych ceragenin, ale również możliwość ich zastosowania jako czynników zwiększających działanie biologiczne innych terapeutyków. Badania na szczepach bakterii Gram-ujemnych, opornych na leczenie klasycznymi antybiotykami, np. erytromycyną, wykazały, iż ceragenina CSA-13 znacznie ułatwia napływ erytromycyny przez zewnętrzną błonę komórkową, umożliwiając osiągnięcie bakteriostatycznego stężenia tego antybiotyku (57). Mając na uwadze powyższe, wydaje się zasadnym, aby ocenić zbliżony efekt w przypadku leków nowotworowych, których wewnątrzkomórkowe stężenie obniżane jest na skutek nadmiernej aktywności transporterów ABC (6). Mając na uwadze dostępne dane literaturowe sugeruje się, iż zmiany w architekturze błony komórkowej indukowane przez związki o aktywności błonowej, a związane z powstawaniem porów w jej obrębie oraz reorganizacją fosfolipidów błonowych (dyfuzja lateralna), znacznie zwiększą przeciwnowotworowe właściwości konwencjonalnych cytostatyków, co umożliwi wykorzystanie tych związków w terapii kombinowanej skutkującej silniejszym efektem terapeutycznym przy jednoczesnym zmniejszeniu działań niepożądanych.

Zastosowanie nanomateriałów jako sposób na modulację aktywności związków biologicznie czynnych

Obserwowany w ostatnich latach gwałtowny rozwój nanotechnologii stworzył możliwość poprawy parametrów farmakokinetycznych i farmakodynamicznych aktualnie stosowanych cytostatyków, a także pozwolił na tworzenie nowych leków przeciwnowotworowych, o niespotykanych dotąd właściwościach, alternatywnych mechanizmach działania i wysokiej aktywności w stosunku do nowotworów lekoopornych.

Zgodnie z ogólnie przyjętą definicją, jako nanocząstki klasyfikuje się struktury, których rozmiar nie przekracza 100 nm przynajmniej w jednym wymiarze. Nanomateriały, w przeciwieństwie do produktów w skali makro, wykazują szereg unikatowych właściwości fizykochemicznych i biologicznych, włączając w to: (i) wysoki stosunek powierzchni do objętości, (ii) silnie rozwiniętą powierzchnię właściwą i jej podatność na funkcjonalizację czynnikami diagnostyczno-terapeutycznymi, (iii) zdolność do przekraczania barier tkankowych, (iv) długi czas retencji w kompartmentach organizmu, (v) zdolność internalizacji do komórek na drodze endocytozy, fagocytozy oraz pinocytozy, a także (v) możliwość wykorzystania różnych dróg podania m.in. drogi donosowej, parenteralnej oraz śródgałkowej, co uwarunkowane jest głównie rozmiarem nanomateriałów (58, 59).

Aktualnie do nanostruktur o potencjalnym zastosowaniu biomedycznym zalicza się głównie materiały oparte na: (i) metalach, tlenkach oraz stopach metali, (ii) lipidach (np. liposomy, micelle), (iii) naturalnych i syntetycznych polimerach biodegradowalnych (np. chitosan) oraz (iv) strukturach węglowych (np. fullereny, nanorurki węglowe) (60). Stale rosnąca liczba doniesień literaturowych potwierdza, iż wyjątkowy charakter aplikacyjny, umożliwiający ich zastosowanie w nowoczesnej terapii onkologicznej, posiadają nanocząstki magnetyczne (MNPs) typu *core-shell* zbudowane z magnetycznego, metalicznego rdzenia oraz powłoki, podatnej na funkcjonalizację, nadającej im szczególne właściwości fizykochemiczne oraz w dużej mierze warunkującej ich biokompatybilność (61). Szczegółowe badania nad strukturą i właściwościami nanocząstek magnetycznych wykazały, iż ich odpowiedni kształt, rozmiar, a także właściwości powłoki nie tylko umożliwiają ich prawidłową biodystrybucję, ale również determinują ich specyficzność terapeutyczną (61-64).

Przeprowadzone badania wykazały, iż mechanizm przeciwnowotworowej aktywności MNPs uwarun-

kowany jest głównie zwiększeniem wytwarzania reaktywnych form tlenu i tym samym, indukcją stresu oksydacyjnego prowadzącego bezpośrednio do uszkodzenia materiału genetycznego komórki rakowej, peroksydacji lipidów błonowych, zaburzenia metabolizmu komórkowego i ostateczne do indukcji procesu apoptozy i śmierci komórki (65). Istotnym jest, iż dzięki immobilizacji specyficznych ligandów naprowadzających (np. kwasu foliowego) na powierzchni nanocząstek, możliwe jest zwiększenie specyficzności oddziaływania nanostruktur w stosunku do komórek rakowych, a tym samym ograniczenie toksycznego wpływu nanocząstek na komórki zdrowe (66-68). Możliwość wykorzystania nanocząstek magnetycznych w obrazowaniu MRI (69, 70), terapii hipertermalnej (71, 72), terapii fotodynamicznej (73), a także obrazowaniu fluorescencyjnym/luminescencyjnym dodatkowo podkreśla ich teranostyczny charakter (61, 71, 74).

Aktualnie, największy potencjał aplikacyjny wydaje się mieć zastosowanie nanocząstek magnetycznych jako nośników substancji leczniczej w systemach kontrolowanego dostarczania leków (ang. *drug delivery systems*, DDS) (75, 76). Potwierdzono, iż immobilizacja czynników przeciwnowotworowych na powierzchni nanomateriałów znacznie nasila kumulację leków w komórkach rakowych oraz poprawia specyficzność działania chemioterapeutyku, zmniejsza działania niepożądane towarzyszące chemioterapii systemowej, poprawia biokompatybilność i stabilność fizykochemiczną cytostatyków (68, 77). Zasadność zastosowania nanocząstek magnetycznych jako nano-nośników leków została dotychczas potwierdzona dla terapii opartej o mitoksantron, idarubicynę czy doksorubicynę (68, 78, 79). Co istotniejsze, sugeruje się, że zastosowanie DDS umożliwia zniesienie lekooporności komórek nowotworowych uwarunkowanej aktywnością ATP-azależnych transporterów z rodziny białek ABC (58, 67, 77).

Aktywność przeciwnowotworowa nanosystemów zawierających substancje o aktywności błonowej z grupy ceragenin

Pomimo iż doniesienia literaturowe nt. zastosowania nanosystemów zawierających substancje aktywne błonowo skupiają się głównie na ocenie ich potencjału w terapii infekcji bakteryjnych lub grzybiczych (62, 63, 80-82), badania przeprowadzone w stosunku do komórek raka piersi (40) oraz raka jelita grubego (55) sugerują możliwość zastosowania tych związków również w terapii chorób nowotworowych.

W pierwszym etapie, zasadność wykorzystania nanocząstek magnetycznych jako nano-nośników dla

peptydu LL-37 oraz cerageniny CSA-13 została potwierdzona w stosunku do komórek raka jelita grubego linii DLD-1 oraz HT-29 (55). Badania przeprowadzone przez Niemirowicz i współ. wykazały, iż aktywność przeciwnowotworowa zarówno peptydu LL-37, jak i cerageniny CSA-13 jest istotnie zwiększona w wyniku ich immobilizacji na powierzchni nanocząstek magnetycznych, co zostało odnotowane jako spadek aktywności metabolicznej komórek, intensyfikacja procesów apoptozy oraz ograniczenie proliferacji komórkowej. Głównym mechanizmem warunkującym powyższe obserwacje było nasilenie wewnątrzkomórkowej internalizacji stosowanych czynników przeciwnowotworowych i tym samym zwiększenie ich akumulacji w docelowych kompartmentach komórkowych. Dzięki obserwacjom przy użyciu mikroskopu konfokalnego oraz zastosowaniu związków znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) oraz jodkiem propidyny (PI) potwierdzono, iż nanocząstki magnetyczne pozostałe po hydrolizie CSA-13 kumulują się w cytoplazmie komórkowej, podczas gdy związki aktywne osiągnęły jądro komórkowe. Biorąc pod uwagę, że wśród rozległych mechanizmów determinujących aktywność przeciwrakową peptydu LL-37 oraz CSA-13 wyróżnia się również zmiany w aktywacji szlaków sygnałowych (41), zasadną wydaje się sugestia, iż immobilizacja związków o aktywności błonowej na powierzchni nanomateriałów umożliwia jeszcze silniejszą aktywację / inhibicję przeciwnowotworowych szlaków sygnałowych.

Dalsze badania określające wartość terapeutyczną nanosystemu zawierającego cerageninę CSA-13 w terapii raka piersi potwierdziły znaczny potencjał nanocząstek magnetycznych jako nośników substancji leczniczej (40), a także wykazały, iż mechanizm determinujący intensyfikację aktywności biologicznej cerageniny CSA-13 nie jest związany jedynie ze zwiększeniem wewnątrzkomórkowego stężenia związku, jak sugerowano w poprzednich badaniach, ale uwarunkowany również przeciwnowotworowymi właściwościami samych nanocząstek tlenku żelaza. Zgodnie z wcześniejszymi raportami, autorzy wykazali, iż ceragenina CSA-13 zimmobilizowana na magnetycznym nano-nośniku osiąga wyższe stężenia wewnątrz komórki rakowej w porównaniu do jego formy niesfunkcjonalizowanej. Ponadto, w świetle stale narastającej lekooporności uwarunkowanej zmniejszeniem dokomórkowego transportu cytostatyków, szczególnie istotne wydają się doniesienia na temat zdolności nanocząstek magnetycznych do internalizacji komórkowej na drodze endocytozy, co pozwala na ominięcie ich wyrzutu przez transportery przezbłonowe z rodziny ABC (78).

W badaniach własnych wykazano, że zwiększenie aktywności przeciwnowotworowej może dodatkowo wynikać ze zdolności MNP do indukcji generowania reaktywnych form tlenu, co wskazuje na możliwy efekt synergistyczny pomiędzy magnetycznymi nanomateriałami, a związkami o aktywności błonowej. W szczególności analiza wydzielania reaktywnych form tlenu w komórkach inkubowanych w obecności CSA-13 oraz jego magnetycznego odpowiednika, a także ocena zmian w wewnątrzkomórkowym stężeniu glutationu, sugeruje, iż dzięki indukcji stresu oksydacyjnego pod wpływem MNP intensyfikacji ulegają zaburzenia w równowadze oksydoredukcyjnej, co leży u podstawy aktywności przeciwnowotworowej cerageniny CSA-13 w stosunku do raka piersi (40).

Zaprezentowane wyniki wyraźnie wskazują na zasadność badań nad przeciwnowotworową aktywnością nanosystemów zawierających substancje aktywne błonowo. Pomimo iż największe nadzieje aplikacyjnie wiąże się aktualnie z zastosowaniem MNP jako nośników leków, należy również uwzględnić możliwość wykorzystania fizykochemicznych właściwości nanostruktur tlenku żelaza w obrazowaniu magnetycznym rezonansem jądrowym MRI oraz indukcji hipertermii. Na chwilę obecną nie ma jednak danych literaturowych na temat wykorzystania związków z grupy ceragenin w takiej aplikacji biologicznej.

WNIOSKI

Pomimo dynamicznego rozwoju nowych terapii przeciwnowotworowych, nadal istotnymi problemami o znaczeniu klinicznym pozostają: niska selektywność współcześnie stosowanych cytostatyków i wynikająca z tego ich wysoka toksyczność, a także stale narastające zjawisko lekooporności komórek nowotworowych o charakterze zarówno pierwotnym, jak i nabytym w trakcie terapii onkologicznej. Z tego też względu, uznaje się, że nowoczesny cytostatyk powinien charakteryzować się nie tylko odpowiednią efektywnością terapeutyczną, ale również cechować się odpowiednią biokompatybilnością i niskim potencjałem do indukcji lekooporności. Realizacja przytoczonych założeń możliwa jest m.in. dzięki zastosowaniu osiągnięć z zakresu nanotechnologii oraz terapii celowanej. Coraz większa ilość danych literaturowych wskazuje, iż nanosystemy składające się z nanocząstek magnetycznych sfunkcjonalizowanych związkami o aktywności błonowej z grupy ceragenin mają szansę stać się poważnymi kandydatami w rozwoju nowych czynników przeciwnowotworowych. Konieczne jest jednak przeprowadzenie

dodatkowych analiz potwierdzających skuteczność w innych typach nowotworów, w tym nowotworów hematologicznych, a także analiza bezpieczeństwa ich stosowania. Zasadnym również wydaje się prze-

prowadzenie badań ukierunkowanych na zastosowanie prezentowanych nanosystemów w obrazowaniu MRI oraz terapii hipertermalnej guzów nowotworowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Lucas A.S., O'Neil B.H., Goldberg R.M.: A decade of advances in cytotoxic chemotherapy for metastatic colorectal cancer, *Clin Colorectal Cancer*, 2011; 10(4):238–44.
2. Das D., Preet R., Mohapatra P., Satapathy S.R., Kundu C.N.: 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea enhances the inhibitory effect of resveratrol on 5-fluorouracil sensitive/resistant colon cancer cells, *World J Gastroenterol*, 2013; 19(42): 7374–88.
3. Holohan C., Van Schaeybroeck S., Longley D.B., Johnston P.G.: Cancer drug resistance: an evolving paradigm, *Nat Rev Cancer*, 2013; 13(10): 714–26.
4. Zheng H.C.: The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers, *Oncotarget*, 2017; 8(35): 59950–64.
5. Mansoori B., Mohammadi A., Davudian S., Shirjang S., Baradaran B.: The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review, *Adv Pharm Bull*, 2017; 7(3): 339–48.
6. Sharom F.J.: ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance, *Pharmacogenomics*, 2008; 9(1): 105–27.
7. Leonard G.D., Fojo T., Bates S.E.: The role of ABC transporters in clinical practice, *Oncologist*, 2003; 8(5): 411–24.
8. Eilers M., Roy U., Mondal D.: MRP (ABCC) transporters-mediated efflux of anti-HIV drugs, saquinavir and zidovudine, from human endothelial cells, *Exp Biol Med (Maywood)*, 2008; 233(9): 1149–60.
9. Sun Y.L., Patel A., Kumar P., Chen Z.S.: Role of ABC transporters in cancer chemotherapy, *Chin J Cancer*, 2012; 31(2): 51–7.
10. Kathawala R.J., Gupta P., Ashby C.R., Chen Z.S.: The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade, *Drug Resist Updat*, 2015; 18: 1–17.
11. Robey R.W., Pluchino K.M., Hall M.D., Fojo A.T., Bates S.E., Gottesman M.M.: Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer, *Nat Rev Cancer*, 2018; 18(7): 452–64.
12. Piktel E., Niemirowicz K., Wątek M., Wollny T., Deptuła P., Bucki R.: Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy, *Journal of Nanobiotechnology*, 2016; 14(1): 39.
13. Mahlapuu M., Hakansson J., Ringstad L., Bjorn C.: Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents, *Front Cell Infect Microbiol*, 2016; 6: 194.
14. Piktel E., Niemirowicz K., Wnorowska U., Wątek M., Wollny T., Głuszek K. et al.: The Role of Cathelicidin LL-37 in Cancer Development. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2016; 64(1): 33–46.
15. Boman H.G.: Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts, *J Intern Med*, 2003; 254(3): 197–215.
16. Bucki R., Leszczyńska K., Namiot A., Sokołowski W.: Cathelicidin LL-37: a multitask antimicrobial peptide, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2010; 58(1): 15–25.
17. Aoki W., Ueda M.: Characterization of Antimicrobial Peptides toward the Development of Novel Antibiotics, *Pharmaceuticals (Basel)*, 2013; 6(8): 1055–81.
18. Hoskin D.W., Ramamoorthy A.: Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides, *Biochim Biophys Acta*, 2008; 1778(2): 357–75.
19. Mu A.K., Lim B.K., Hashim O.H., Shuib A.S.: Identification of O-glycosylated proteins that are aberrantly excreted in the urine of patients with early stage ovarian cancer, *Int J Mol Sci*, 2013; 14(4): 7923–31.
20. Tian Y., Esteva F.J., Song J., Zhang H.: Altered expression of sialylated glycoproteins in breast cancer using hydrazide chemistry and mass spectrometry, *Mol Cell Proteomics*, 2012; 11(6): M111.011403.
21. Fadnes B., Rekdal O., Uhlin-Hansen L.: The anticancer activity of lytic peptides is inhibited by heparan sulfate on the surface of the tumor cells, *BMC Cancer*, 2009; 9: 183.
22. Utsugi T., Schroit A.J., Connor J., Bucana C.D., Fidler I.J.: Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes, *Cancer Res*, 1991; 51(11): 3062–6.
23. Sok M., Sentjurs M., Schara M., Stare J., Rott T.: Cell membrane fluidity and prognosis of lung cancer, *Ann Thorac Surg*, 2002; 73(5): 1567–71.
24. Berger M., Motta C., Boiret N., Aublet-Cuvelier B., Bonhomme J., Travade P.: Membrane fluidity and adherence to extracellular matrix components are related to blast cell count in acute myeloid leukemia, *Leuk Lymphoma*, 1994; 15(3–4): 297–302.
25. Li X., Shen B., Chen Q., Zhang X., Ye Y., Wang F.: Antitumor effects of cecropin B-LHRH' on drug-resistant ovarian and endometrial cancer cells, *BMC Cancer*, 2016; 16: 251.
26. Chan S.C., Hui L., Chen H.M.: Enhancement of the cytolytic effect of anti-bacterial cecropin by the microvilli of cancer cells, *Anticancer Res*, 1998; 18(6A): 4467–74.
27. Risso A., Braidot E., Sordano M.C., Vianello A., Macrì F., Skerlavaj B. et al.: BMAP-28, an antibiotic peptide of innate immunity, induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore, *Mol Cell Biol*, 2002; 22(6): 1926–35.

28. Kuroda K., Fukuda T., Yoneyama H., Katayama M., Isogai H., Okumura K. et al.: Anti-proliferative effect of an analogue of the LL-37 peptide in the colon cancer derived cell line HCT116 p53+/+ and p53-/-, *Oncol Rep.*, 2012; 28(3): 829–34.
29. Lee C., Bae S.S., Joo H., Bae H.: Melittin suppresses tumor progression by regulating tumor-associated macrophages in a Lewis lung carcinoma mouse model, *Oncotarget.*, 2017; 8(33): 54951–65.
30. Arias M., Hilchie A.L., Haney E.F., Bolscher J.G., Hyndman M.E., Hancock R.E. et al.: Anticancer activities of bovine and human lactoferricin-derived peptides, *Biochem Cell Biol.*, 2017; 95(1): 91–8.
31. Meyer J.E., Harder J., Görögh T., Weise J.B., Schubert S., Janssen D. et al.: Human beta-defensin-2 in oral cancer with opportunistic Candida infection, *Anticancer Res.*, 2004; 24(2B): 1025–30.
32. Lai X.Z., Feng Y., Pollard J., Chin J.N., Rybak M.J., Bucki R. et al.: Ceragenins: cholic acid-based mimics of antimicrobial peptides, *Acc Chem Res.*, 2008; 41(10): 1233–40.
33. Surel U., Niemirowicz K., Marzec M., Savage P.B., Bucki R.: Ceragenins – a new weapon to fight multidrug resistant bacterial infections, *Studia Medyczne*, 2014; 30(3): 207–13.
34. Bucki R., Niemirowicz K., Wnorowska U., Byfield F.J., Piktel E., Wątek M. et al.: Bactericidal activity of ceragenin CSA-13 in cell culture and an animal model of peritoneal infection, *Antimicrob Agents Chemother.*, 2015; 59(10): 6274–82.
35. Moscoso M., Esteban-Torres M., Menéndez M., García E.: In vitro bactericidal and bacteriolytic activity of ceragenin CSA-13 against planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus pneumoniae* and other pathogenic streptococci, *PLoS One.*, 2014; 9(7): e101037.
36. Durnaś B., Wnorowska U., Pogoda K., Deptuła P., Wątek M., Piktel E. et al.: Candidacidal Activity of Selected Ceragenins and Human Cathelicidin LL-37 in Experimental Settings Mimicking Infection Sites, *PLoS One*, 2016; 11(6): e0157242.
37. Niemirowicz K., Durnaś B., Tokajuk G., Piktel E., Michalak G., Gu X. et al.: Formulation and candidacidal activity of magnetic nanoparticles coated with cathelicidin LL-37 and ceragenin CSA-13, *Sci Rep.*, 2017; 7(1): 4610.
38. Lara D., Feng Y., Bader J., Savage P.B., Maldonado R.A.: Antitrypanosomatid activity of ceragenins, *J Parasitol.*, 2010; 96(3): 638–42.
39. Howell M.D., Streib J.E., Kim B.E., Lesley L.J., Dunlap A.P., Geng D. et al.: Ceragenins: a class of antiviral compounds to treat orthopox infections, *J Invest Dermatol.*, 2009; 129(11): 2668–75.
40. Piktel E., Prokop I., Wnorowska U., Krol G., Ciesluk M., Niemirowicz K. et al.: Ceragenin CSA-13 as free molecules and attached to magnetic nanoparticle surfaces induce caspase-dependent apoptosis in human breast cancer cells via disruption of cell oxidative balance, *Oncotarget.*, 2018; 9(31): 21904–20.
41. Wu W.K., Sung J.J., To K.F., Yu L., Li H.T., Li Z.J. et al.: The host defense peptide LL-37 activates the tumor-suppressing bone morphogenetic protein signaling via inhibition of proteasome in gastric cancer cells, *J Cell Physiol.*, 2010; 223(1): 178–86.
42. Prevete N., Liotti F., Visciano C., Marone G., Melillo R.M., de Paulis A.: The formyl peptide receptor 1 exerts a tumor suppressor function in human gastric cancer by inhibiting angiogenesis, *Oncogene.*, 2015; 34(29): 3826–38.
43. Ren S.X., Cheng A.S., To K.F., Tong J.H., Li M.S., Shen J. et al.: Host immune defense peptide LL-37 activates caspase-independent apoptosis and suppresses colon cancer, *Cancer Res.*, 2012; 72(24): 6512–23.
44. Ren S.X., Shen J., Cheng A.S., Lu L., Chan R.L., Li Z.J. et al.: FK-16 derived from the anticancer peptide LL-37 induces caspase-independent apoptosis and autophagic cell death in colon cancer cells, *PLoS One.*, 2013; 8(5): e63641.
45. Mader J.S., Mookherjee N., Hancock R.E., Bleackley R.C.: The human host defense peptide LL-37 induces apoptosis in a calpain- and apoptosis-inducing factor-dependent manner involving Bax activity, *Mol Cancer Res.*, 2009; 7(5): 689–702.
46. Castells M., Milhas D., Gandy C., Thibault B., Rafii A., Delord J.P. et al.: Microenvironment mesenchymal cells protect ovarian cancer cell lines from apoptosis by inhibiting XIAP inactivation, *Cell Death Dis.*, 2013; 4: e887.
47. Coffelt S.B., Waterman R.S., Florez L., Höner zu Bentrop K., Zvezdaryk K.J., Tomchuck S.L. et al.: Ovarian cancers overexpress the antimicrobial protein hCAP-18 and its derivative LL-37 increases ovarian cancer cell proliferation and invasion, *Int J Cancer.*, 2008; 122(5): 1030–9.
48. Cohen S., Bruchim I., Graiver D., Evron Z., Oron-Karni V., Pasmanik-Chor M. et al.: Platinum-resistance in ovarian cancer cells is mediated by IL-6 secretion via the increased expression of its target cIAP-2, *J Mol Med (Berl.)*, 2013; 91(3): 357–68.
49. Heilborn J.D., Nilsson M.F., Jimenez C.I., Sandstedt B., Borregaard N., Tham E. et al.: Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells, *Int J Cancer.*, 2005; 114(5): 713–9.
50. Hensel J.A., Chanda D., Kumar S., Sawant A., Grizzle W.E., Siegal G.P. et al.: LL-37 as a therapeutic target for late stage prostate cancer, *Prostate.*, 2011; 71(6): 659–70.
51. Kim J.E., Kim H.J., Choi J.M., Lee K.H., Kim T.Y., Cho B.K. et al.: The antimicrobial peptide human cationic antimicrobial protein-18/cathelicidin LL-37 as a putative growth factor for malignant melanoma, *Br J Dermatol.*, 2010; 163(5): 959–67.
52. von Haussen J., Koczulla R., Shaykhiev R., Herr C., Pinkenburg O., Reimer D. et al.: The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells, *Lung Cancer.*, 2008; 59(1): 12–23.
53. Girnita A., Zheng H., Grönberg A., Girnita L., Ståhle M.: Identification of the cathelicidin peptide LL-37 as agonist for the type I insulin-like growth factor receptor, *Oncogene.*, 2012; 31(3): 352–65.
54. Kuroda K., Fukuda T., Okumura K., Yoneyama H., Isogai H., Savage P.B. et al.: Ceragenin CSA-13 induces cell cycle arrest and antiproliferative effects in wild-type and p53 null mutant HCT116 colon cancer cells, *Anticancer Drugs.*, 2013; 24(8): 826–34.
55. Niemirowicz K., Prokop I., Wilczewska A.Z., Wnorowska U., Piktel E., Wątek M. et al.: Magnetic nanoparticles enhance

- the anticancer activity of cathelicidin LL-37 peptide against colon cancer cells, *Int J Nanomedicine*, 2015; 10: 3843–53.
56. Durnaś B., Wnorowska U., Pogoda K., Deptuła P., Wątek M., Piktel E. et al.: Candidacidal Activity of Selected Ceragenins and Human Cathelicidin LL-37 in Experimental Settings Mimicking Infection Sites, *Plos One*, 2016; 11(6): e0157242.
57. Saha S., Savage P.B., Bal M.: Enhancement of the efficacy of erythromycin in multiple antibiotic-resistant gram-negative bacterial pathogens, *J Appl Microbiol.*, 2008; 105(3): 822–8.
58. Piktel E., Niemirowicz K., Wątek M., Wollny T., Deptuła P., Bucki R.: Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy, *J Nanobiotechnology*, 2016; 14(1): 39.
59. Oh N., Park J.H.: Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells, *Int J Nanomedicine*, 2014; 9 (Suppl 1): 51–63.
60. Hemeg H.A.: Nanomaterials for alternative antibacterial therapy, *Int J Nanomedicine*, 2017; 12: 8211–25.
61. Niemirowicz K., Markiewicz K.H., Wilczewska A.Z., Car H.: Magnetic nanoparticles as new diagnostic tools in medicine, *Adv Med Sci.*, 2012; 57(2): 196–207.
62. Niemirowicz K., Świącicka I., Wilczewska A.Z., Misztalewska I., Kalska-Szostko B., Bienias K. et al.: Gold-functionalized magnetic nanoparticles restrict growth of *Pseudomonas aeruginosa*, *Int J Nanomedicine*, 2014; 9: 2217–24.
63. Niemirowicz K., Surel U., Wilczewska A.Z., Mystkowska J., Piktel E., Gu X. et al.: Bactericidal activity and biocompatibility of ceragenin-coated magnetic nanoparticles, *J Nanobiotechnology*, 2015; 13(1): 32.
64. Niemirowicz K., Prokop I., Wilczewska A.Z., Wnorowska U., Piktel E., Wątek M. et al.: Magnetic nanoparticles enhance the anticancer activity of cathelicidin LL-37 peptide against colon cancer cells, *International Journal of Nanomedicine*, 2015; 10: 3843–53.
65. Vinardell M.P., Mitjans M.: Antitumor Activities of Metal Oxide Nanoparticles, *Nanomaterials (Basel)*, 2015; 5(2): 1004–21.
66. Rana S., Shetake N.G., Barick K.C., Pandey B.N., Salunke H.G., Hassan P.A.: Folic acid conjugated Fe, *Dalton Trans.*, 2016; 45(43): 17401–8.
67. Luo X., Peng X., Hou J., Wu S., Shen J., Wang L.: Folic acid-functionalized polyethylenimine superparamagnetic iron oxide nanoparticles as theranostic agents for magnetic resonance imaging and PD-L1 siRNA delivery for gastric cancer, *Int J Nanomedicine*, 2017; 12: 5331–43.
68. Barar J., Kafil V., Majd M.H., Barzegari A., Khani S., Johari-Ahar M. et al.: Multifunctional mitoxantrone-conjugated magnetic nanosystem for targeted therapy of folate receptor-overexpressing malignant cells, *J Nanobiotechnology*, 2015; 13(1): 26.
69. Du B., Han S., Li H., Zhao F., Su X., Cao X. et al.: Multifunctional liposomes showing radiofrequency-triggered release and magnetic resonance imaging for tumor multi-mechanism therapy, *Nanoscale*, 2015; 7(12): 5411–26.
70. Yallapu M.M., Othman S.F., Curtis E.T., Gupta B.K., Jaggi M., Chauhan S.C.: Multi-functional magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and cancer therapy, *Biomaterials*, 2011; 32(7): 1890–905.
71. Alvarez-Berrios M.P., Castillo A., Mendéz J., Soto O., Rinaldi C., Torres-Lugo M.: Hyperthermic potentiation of cisplatin by magnetic nanoparticle heaters is correlated with an increase in cell membrane fluidity, *Int J Nanomedicine*, 2013; 8: 1003–13.
72. Chen E.Y., Samkoe K.S., Hodge S., Tai K., Hou H., Petryk A.A. et al.: Modulation of hypoxia by magnetic nanoparticle hyperthermia to augment therapeutic index, *Adv Exp Med Biol*, 2014; 812: 87–95.
73. Park B.J., Choi K.H., Nam K.C., Ali A., Min J.E., Son H. et al.: Photodynamic Anticancer Activities of Multifunctional Cobalt Ferrite Nanoparticles in Various Cancer Cells, *J Biomed Nanotechnol.*, 2015; 11(2): 226–35.
74. Du Y., Lai P.T., Leung C.H., Pong P.W.: Design of superparamagnetic nanoparticles for magnetic particle imaging (MPI), *Int J Mol Sci*, 2013; 14(9): 18682–710.
75. Wilczewska A.Z., Niemirowicz K., Markiewicz K.H., Car H.: Nanoparticles as drug delivery systems., *Pharmacol Rep.*, 2012; 64(5): 1020–37.
76. Chomoucka J., Drbohlavova J., Huska D., Adam V., Kizek R., Hubalek J.: Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering, *Pharmacol Res.*, 2010; 62(2): 144–9.
77. Chidambaram M., Manavalan R., Kathiresan K.: Nanotherapeutics to overcome conventional cancer chemotherapy limitations, *J Pharm Pharm Sci.*, 2011; 14(1): 67–77.
78. Gunduz U., Keskin T., Tansik G., Mutlu P., Yalcin S., Unsoy G. et al.: Idarubicin-loaded folic acid conjugated magnetic nanoparticles as a targetable drug delivery system for breast cancer, *Biomed Pharmacother.*, 2014; 68(6): 729–36.
79. Kossatz S., Grandke J., Couleaud P., Latorre A., Aires A., Crosbie-Staunton K. et al.: Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery, *Breast Cancer Res.*, 2015; 17: 66.
80. Durnaś B., Piktel E., Wątek M., Wollny T., Gózdź S., Smok-Kalwat J. et al.: Anaerobic bacteria growth in the presence of cathelicidin LL-37 and selected ceragenins delivered as magnetic nanoparticles cargo, *Bmc Microbiology*, 2017; 17(1): 167.
81. Michalak G., Głuszek K., Piktel E., Deptuła P., Puszkarz I., Niemirowicz K. et al.: Polymeric nanoparticles – a novel solution for delivery of antimicrobial agents, *Medical Studies-Studia Medyczne*, 2016; 32(1): 56–62.
82. Niemirowicz K., Piktel E., Wilczewska A.Z., Markiewicz K.H., Durnaś B., Wątek M. et al.: Core-shell magnetic nanoparticles display synergistic antibacterial effects against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* when combined with cathelicidin LL-37 or selected ceragenins, *Int J Nanomedicine*, 2016; 11: 5443–55.
83. Choi C.H.: ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal, *Cancer Cell Int.*, 2005; 5: 30.

Znaczenie współzależności FGFR2 – RSK2 w progresji raka piersi. Badania *in vitro* oraz analizy materiału klinicznego

Significance of FGFR2 – RSK2 interdependence for breast cancer progression. In vitro studies and clinical material analyses

Dominika Czaplińska¹

¹Katedra Biotechnologii Medycznej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Gdański i Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk

Finansowanie: Dr Dominika Czaplińska otrzymała w 2017 roku stypendium naukowe przyznawane przez Naukową Fundację Polpharmy wybitnie zdolnym studentom studiów doktoranckich uczelni medycznych. Stypendium doktoranckie Naukowej Fundacji Polpharmy (2017), Narodowe Centrum Nauki – grant Preludium (2014/15/N/NZ3/04305), Narodowe Centrum Nauki – grant Etiuda (2017/24/T/NZ3/00082), stypendium doktoranckie w ramach projektu "Program rozwoju Uniwersytetu Gdańskiego w obszarach Europa 2020 (UG 2020)".

Streszczenie

Proces transformacji nowotworowej wywołany jest zmianami genetycznymi lub epigenetycznymi prowadzącymi do zaburzeń w funkcjonowaniu ścieżek sygnalizacji komórkowej. Ze zmianami nowotworowymi w obrębie gruczołu piersiowego może wiązać się deregulacja sygnalizacji kinaz z rodziny RSK (*ribosomal s6 kinase*). Podwyższoną ekspresję RSK1 i RSK2 zaobserwowano w około 50% przypadków raka piersi w porównaniu z tkanką niezmienną nowotworowo.

Celem realizowanego projektu była analiza wpływu kinazy RSK2 na rozwój i progresję raka piersi. Projekt obejmował badania *in vitro* w modelach komórkowych oraz analizy materiału klinicznego pochodzącego od chorych na raka piersi.

W przedstawionej pracy wykazano, że kinaza RSK2 aktywowana jest przez FGFR2 (*fibroblast growth factor receptor 2*) po związaniu liganda (FGF2) w epitelialnych i nowotworowych komórkach piersi. Dowiedziono, że ścieżka FGF2/FGFR2/RSK2 promuje wzrost niezależny od przylegania do podłoża oraz migrację komórek, czyli procesy kluczowe dla progresji nowotworowej. Analizy ekspresji FGFR2 i RSK2 w guzach chorych na raka piersi wykazały pozytywną korelację między tymi czynnikami zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Współczynnik korelacji był najwyższy w przypadku potrójnie-negatywnego raka piersi (TNBC), który uznawany jest za najbardziej agresywny i oporny na leczenie podtyp. Ekspresja FGFR2 i/lub aktywnej formy RSK (RSK-P) korelowała z krótszym czasem przeżycia wolnego od nawrotu choroby (DFS).

Podsumowując uzyskane wyniki, można jednoznacznie stwierdzić, że aktywna ścieżka FGFR2-RSK2 związana jest z progresją raka piersi oraz może stanowić potencjalny cel molekularny w terapii raka piersi.

Słowa kluczowe: rak piersi, FGFR2, RSK2

Abstract

The members of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) family of Ser/Thr kinases are downstream effectors of MAPK/ERK pathway that regulate

Wpłynęło: 04-04-2019
Zaakceptowano: 10-04-2019
Opublikowano: 15-05-2019

Adres do korespondencji
dr Dominika Czaplińska
Katedra Biotechnologii Medycznej,
Gdański Uniwersytet Medyczny, ul.
Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
tel.: +48 (58) 349 14 38; e-mail:
dominika.czaplińska@gumed.edu.pl

diverse cellular processes including cell growth, proliferation and survival. In carcinogenesis, RSKs are thought to modulate cell motility, invasion and metastasis. Elevated level of RSK1 and RSK2 was found in about 50% of breast tumours and is associated with a poor survival outcome.

The project aims to investigate the role of RSK2 kinase in breast cancer progression out at two complementary levels: *in vitro* studies and analyses of samples from breast cancer patients.

We demonstrated that in breast epithelial and cancer cell lines stimulation of FGFR2 (*fibroblast growth factor receptor 2*) with FGF2 induced activation of RSK2-Tyr529 and that this new signalling pathway promoted anchorage-independent cell proliferation, formation of focal adhesions and cell migration. In clinical analyses FGFR2 showed a positive correlation with RSK2 at both protein ($p = 0.003$) and mRNA ($p = 0.001$) levels. The values of correlation coefficients were the highest in triple-negative breast cancer (TNBC), which is more aggressive and has a poorer prognosis than other breast cancer subtypes. Moreover, expression of FGFR2 and/or activated RSK (RSK-P) significantly correlated with poor disease-free survival (DFS) of patients ($p = 0.01$).

Taken together, our results suggest that FGFR2-RSK2 signalling pathway is associated with breast cancer progression and further studies of FGFR2-RSK2 interdependence may contribute to the development of new therapeutic strategies in the management of patients with breast cancer.

Keywords: breast cancer, FGFR2, RSK2

WPROWADZENIE – STAN WIEDZY W CHWILĘ ROZPOCZĘCIA PROJEKTU

Budowa i znaczenie RSK2 w raku piersi

Do rodziny białek RSK (*ribosomal s6 kinase*) należą cztery kinazy serynowo-treoninowe RSK1-RSK4 oraz ich dwa homologi MSK1 oraz MSK2 (*mitogen and stress activated kinases*). Wszystkie izoformy RSK występujące u kręgowców (RSK1-RSK4) charakteryzują się dużym podobieństwem budowy (73-80% homologii w sekwencji aminokwasów) (1). Aktywowane są przez szlak MAPK/ERK pod wpływem czynników wzrostu, hormonów peptydowych i neuroprzekazników (1–3). Cechą charakterystyczną tych kinaz jest jednoczesne występowanie dwóch różnych domen o aktywności katalitycznej. Domena C-terminalna (CTKD, *C-terminal kinase domain*) odpowiada za odbiór sygnałów aktywujących i przekazywanie ich do domeny N-terminalnej (NTKD, *N-terminal kinase domain*), która następnie fosforyluje substraty RSK (1,4). Domeny oddziela od siebie łącznik o długości około 100 aminokwasów, w którym zlokalizowane są sekwencje regulatorowe biorące udział w aktywacji NTKD. Do tej pory nie zidentyfikowano żadnych egzogennych substratów CTKD (1).

Aktywna kinaza RSK działa na substraty obecne w cytoplazmie lub ulega translokacji do jądra komórkowego, gdzie fosforyluje wiele białek jądrowych i czynników transkrypcyjnych. Aktywność RSK wpływa na cykl komórkowy, proliferację, przeżycie i wzrost komórek (1).

Poza kanonicznym modelem aktywacji (opisanym powyżej) odkryto szereg alternatywnych mechanizmów aktywacji białek z rodziny RSK. W komórkach dendrytycznych kinazy RSK mogą być aktywowane przez p38 za pośrednictwem MK2 lub MK3 (*MAPK-activated kinase-2/3*) (5). W komórkach hemopoetycznych odkryto bezpośrednią fosforylację RSK2-Tyr529 przez FGFR3 (*fibroblast growth factor receptor 3*, receptor dla czynnika wzrostu fibroblastów 3) (6). Inny model opracowany przez ten sam zespół opisuje aktywację RSK2-Tyr529 poprzez kinazy Src i Fyn na skutek stymulacji EGF (*epidermal growth factor*, epidermalny czynnik wzrostu) (7). Oba mechanizmy zakładają, że fosforylacja w obrębie Tyr529 ułatwia wiązanie nieaktywnej kinazy ERK i następnie aktywację pozostałych miejsc fosforylacji w obrębie RSK2, co nadaje jej pełną aktywność (6,7). Ponadto wykazano, że RSK1 aktywowane jest przez ścieżkę sygnalizacyjną FGFR2 (*fibroblast growth fac-*

tor receptor 2) w komórkach epitelialnych płuca (8). Dowiedziano również, że RSK2 jest bezpośrednio fosforylowane przez FGFR1 (*fibroblast growth factor receptor 1*) w komórkach kostniakomięsaka oraz reguluje endocytozę tego receptora (9). Wydaje się więc, że receptory z rodziny FGFR pełnią istotną rolę w aktywacji kinaz RSK. Dotychczas nie wykazano jednak funkcjonalnego powiązania FGFR2 i RSK2.

Mimo iż kinazy z rodziny RSK wykazują aż 73-80% homologii w sekwencji aminokwasowej, mogą one pełnić różne, czasami przeciwstawne, funkcje (1,10,11). Wynika to z różnic w ich aktywacji przez odmienne ścieżki sygnalizacyjne, a także z różnych poziomów ekspresji konkretnych izoform w danej tkance/linii komórkowej (11). W kontekście roli RSK w kancerogenezie, zdecydowana większość publikacji jest w zgodzie, że RSK2 promuje progresję nowotworową. Rola RSK1 jest mniej jednoznaczna, ponieważ kinaza ta może wywierać zarówno pozytywny, jak i negatywny wpływ na rozwój nowotworu, zależnie od jego rodzaju (10,11). Podwyższoną ekspresję RSK1 i RSK2 zaobserwowano w około 50% przypadków raka piersi w porównaniu z tkanką niezmienną nowotworowo (12). Wykazano, że w komórkach epitelialnych piersi RSK1 i RSK2 są jednymi z głównych efektorów ścieżki MAPK/ERK i regulują ekspresję ponad 50 genów, których produkty odpowiadają za migrację i inwazję komórek (m.in. laminina 332, $\alpha_6\beta_4$ -integryna, uPA, uPAR, VEGF-A, CD44, MMP-1, MMP-9 oraz MMP-10) (13).

Wyciszenie ekspresji RSK2 w komórkach HNSCC (*head and neck squamous-cell carcinoma*, rak płaskokomórkowy głowy i szyi) spowodowało znaczne ograniczenie liczby przerzutów w modelu mysim. Analiza próbek klinicznych wykazała, że ekspresja RSK2 koreluje z przerzutowaniem do węzłów chłonnych oraz jest negatywnym czynnikiem prognostycznym dla chorych z HNSCC (14). Co szczególnie istotne w kontekście niniejszej pracy, wysoka ekspresja RSK2 jest markerem gorszego przeżycia wolnego od nawrotu choroby (DFS, *disease free survival*) u chorych na raka piersi (15). Dodatkowo wykazano, że zastosowanie specyficznych inhibitorów RSK lub siRNA (*small interfering RNA*) wyciszających ekspresję RSK2 hamują wzrost i samoodnowę populacji nowotworowych komórek macierzystych (TIC, *tumour initiating cells*) oraz powstrzymują rozwój raka piersi w modelu mysim (15).

Budowa i znaczenie FGFR2 w raku piersi

Receptory dla czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR, *fibroblast growth factor receptors*) to grupa silnie konserwowanych ewolucyjnie białek błonowych o ak-

tywności kinazy tyrozynowej, odpowiadających za regulację kluczowych procesów takich jak: podziały komórkowe, angiogeneza i różnicowanie. U człowieka występują cztery rodzaje receptorów – FGFR1, FGFR2, FGFR3 i FGFR4 oraz 18-22 rodzaje aktywujących je ligandów – FGF (*fibroblast growth factors*, czynniki wzrostu fibroblastów) (16–18). Alternatywny splicing umożliwia powstanie wielu izoform FGFR o różnym powinowactwie wobec określonych ligandów. Na przykład FGFR2 występuje w dwóch izoformach – IIb i IIc. Pierwsza z nich jest charakterystyczna dla tkanek epitelialnych i wiąże FGF1, FGF3, FGF7, FGF10 i FGF22, natomiast FGFR2-IIc występuje w tkankach o pochodzeniu mezenchymalnym i wykazuje specyficzność wobec FGF1, FGF2, FGF4, FGF5, FGF6, FGF8, FGF9, FGF16, FGF17 i FGF18 (18). FGF produkowane są jako glikoproteiny wiążące się z ECM i błoną komórkową za pośrednictwem cząsteczek siarczanu heparyny (HSPG, *heparan sulfate proteoglycans*), które chronią FGF przed działaniem enzymów proteolitycznych, a także stabilizują wiązanie FGF-FGFR (17).

Wśród elementów budowy FGFR wyróżnia się: 1) część zewnątrzkomórkową złożoną z trzech domen immunoglobulino-podobnych (*Ig-like I-III domains*), której rolą jest wiązanie liganda, 2) domenę przezbłonową i 3) domenę wewnątrzkomórkową o aktywności kinazy tyrozynowej (16). Po związaniu liganda FGFR dimeryzują, tworząc homo- lub heterodimery, w następstwie czego dochodzi do transfosforylacji ich cytoplazmatycznych domen o aktywności kinazy i inicjacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych. Następnie kompleks FGFR-FGF ulega internalizacji w wyniku endocytozy i degradacji lizosomalnej (16,17).

FGFR bezpośrednio aktywuje dwa białka adaptorowe – FRS2 (*FGFR substrate 2*) i PLC γ (*phospholipase C γ*). FRS2 inicjuje dwie ścieżki sygnalizacyjne – PI3K/Akt oraz Ras/MAPK, odpowiedzialne za regulację m.in. proliferacji i apoptozy. PLC γ , niezależnie od FRS2, odpowiada za aktywację zbieżnej z MAPK PKC (*protein kinase C*) zaangażowanej we wzrost komórek i odpowiedź immunologiczną (17). Ponadto receptory FGF mogą aktywować wiele innych ścieżek sygnalizacyjnych m.in. RSK, p38 MAPK, STAT i c-Jun (16,17,19).

Deregulację sygnalizacji FGF-FGFR obserwuje się w wielu typach nowotworów (19). Badanie ponad 1000 różnych mutacji w 210 przypadkach różnych nowotworów (m.in. piersi, płuc, jajnika i żołądka) wykazało, że ścieżka FGF ulega mutacjom najczęściej ze wszystkich analizowanych szlaków kinaz białkowych (20). FGFR może promować progresję choro-

by nowotworowej na dwa sposoby: 1) bezpośrednio stymulując proliferację komórek nowotworowych, 2) pośrednio wpływając na wzrost guza poprzez aktywację angiogenezy (17,19).

Nieprawidłowości w sygnalizacji FGFR mogą być spowodowane nadmierną aktywacją receptorów przez ligandy na skutek nadprodukcji FGF (wydzielanych przez komórki nowotworowe lub komórki mikrośrodowiska) lub niezależną od ligandów konstytutywną aktywacją domeny kinazowej na skutek mutacji, translokacji, alternatywnego splicingu lub amplifikacji genu receptora (19). Ścieżka FGF-FGFR może również promować angiogenezę. Czynniki wzrostu fibroblastów były jedynymi z pierwszych odkrytych czynników proangiogennych, które biorą udział we wszystkich etapach angiogenezy, aktywując FGFR1 i FGFR2 w błonie komórek endotelialnych (21–23).

Wyniki metaanalizy dowodzą, że SNP (*single nucleotide polymorphism*, polimorfizm pojedynczego nukleotydu) (rs1219648) w obrębie intronu 2 genu *FGFR2* związany jest z wyższym ryzykiem zachorowalności na raka piersi (24). Amplifikacja *FGFR2* występuje w niewielkim odsetku przypadków nowotworów piersi (1-2%), najczęściej w wysoce agresywnym potrójnie-negatywnym raku piersi (TNBC) (dotyczy około 4% przypadków) (25). Co istotne, linie komórkowe reprezentujące podtyp TNBC i posiadające amplifikację *FGFR2* wykazywały szczególną wrażliwość na drobnocząsteczkowe inhibitory FGFR oraz wyciszenie ekspresji *FGFR2* (25). Wysoki poziom białka FGFR2 w guzie korelował ze stopniem zaawansowania choroby oraz skróconym czasem ogólnego przeżycia pacjentek (26). Ponadto nowotworowe komórki macierzyste wyizolowane od chorych na raka piersi charakteryzowały się podwyższoną ekspresją FGFR2 (na poziomie białka i mRNA). Wyciszenie ekspresji FGFR2 w mysich komórkach macierzystych znacznie obniżyło ich zdolność do samoodnowy populacji, a zastosowanie inhibitora FGFR w modelu *in vivo* spowodowało zahamowanie wzrostu guza (27).

FGFR2 i inni przedstawiciele rodziny FGFR są przedmiotem wielu badań mających na celu rejestrację nowych leków przeciwnowotworowych. Wśród testowanych związków można wyróżnić: 1) selektywne i nieselektywne inhibitory kinaz tyrozynowych, 2) przeciwciała monoklonalne, 3) białka fuzyje (*FGF-ligand traps*) (17,28). Niespecyficzne inhibitory kinaz tyrozynowych działające również na FGFR (m.in. Lenvatinib, Regorafenib, Ponatinib) uzyskały pozytywne opinie amerykańskiej Agencji Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) i zostały do-

puszczone do leczenia różnych typów nowotworów (28). Skuteczność selektywnych inhibitorów FGFR została dotychczas dowiedziona w mysich modelach raka piersi (29).

CELE PRACY

Mimo tego, że kinazy z rodziny RSK charakteryzują się wysoką zgodnością sekwencji aminokwasowej, mogą pełnić różne, czasami przeciwstawne funkcje. Konieczne jest lepsze poznanie ich roli w raku piersi.

Istnieje szereg publikacji opisujących współzależności między różnymi przedstawicielami rodzin FGFR i RSK, jednak funkcjonalne połączenie między FGFR2 i RSK2 nie zostało do tej pory wykazane.

Celem projektu była weryfikacja następującej hipotezy: RSK2 jest jednym z kluczowych regulatorów aktywności FGFR2 w komórkach gruczołu piersiowego a oddziaływania między tymi białkami przyczyniają się do progresji nowotworowej.

Udział RSK2 w ścieżce FGFR2/FGF2

Przeprowadzono analizę ekspresji receptorów FGFR oraz kinaz RSK w liniach komórkowych wyizolowanych z gruczołu piersiowego (HB2, SKBR3, MDA-MB-231). Zaobserwowano, że wyciszenie ekspresji FGFR2 we wszystkich trzech modelach komórkowych znacząco obniżyło fosforylację RSK2-Tyr529 (przeciwciała specyficzne wobec RSK2) oraz pozostałych miejsc tj. Thr573, Ser380 i Thr359/Ser363 (przeciwciała rozpoznające wszystkie izoformy RSK). Konstrukty wykorzystany do wyciszenia FGFR2 nie wpłynął na zmianę poziomu pozostałych receptorów FGFR (30). Następnie komórki poddano "głodzeniu" przez noc w pożywce bezsurowiczej. W liniach typu *wild-type* stymulacja FGF2 skutkowała fosforylacją RSK2 w obrębie wszystkich analizowanych miejsc fosforylacji. Efekt ten był niezauważalny w przypadku komórek z wyciszoną ekspresją FGFR2. Widoczny wpływ wyciszenia FGFR2 na regulację RSK2 w komórkach posiadających inne receptory dla czynnika wzrostu fibroblastów (FGFR1 i FGFR4) sugeruje, kinaza RSK2 jest aktywowana specyficznie w ścieżce sygnalizacyjnej FGFR2 (Ryc. 1). Jako dodatkową kontrolę wykorzystano linię HB2 z nadekspresją FGFR1. Stymulacja FGF2 spowodowała aktywację RSK2, jednak nie zaobserwowano różnic między komórkami ze zwiększonym poziomem FGFR1 a komórkami kontrolnymi, co sugeruje, że FGFR1 (w przeciwieństwie do FGFR2) nie wpływa na aktywację RSK2 w komórkach gruczołu piersiowego (30).

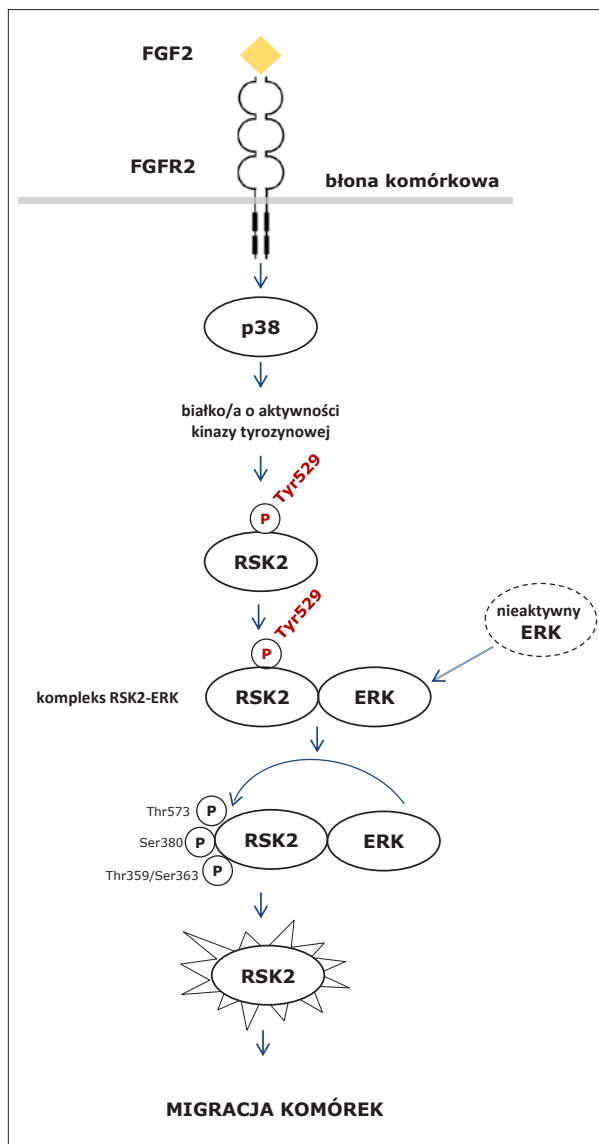
Efekty biologiczne ścieżki FGFR2-RSK2

Następnym etapem projektu było zidentyfikowanie efektów biologicznych, w które zaangażowana jest ścieżka FGFR2-RSK2. Aktywność migracyjna komórek HB2 została oceniona w teście z wykorzystaniem komór Boydena. Komórkom głodzionym w pożywce bezsurowiczej pozwolono migrować do pożywki zawierającej 10% surowicy z dodatkiem FGF2 i/lub inhibitora RSK (FMK). FGF2 blisko o 50% zwiększył migrację komórek. Wpływ FGF2 został zniwelowany przez zastosowanie inhibitora RSK, który ograniczył aktywność migracyjną do 20 i 30% (bez oraz z FGF2) w stosunku do kontroli. W kolejnym doświadczeniu komórki HB2 hodowano w „miękkim” agarze w celu oceny ich zdolności do wzrostu w warunkach niezależnych od adhezji. Obecność FGF2 blisko czterokrotnie zwiększyła objętość kolonii. Efekt FGF2 został niemal całkowicie zniesiony przy zastosowaniu inhibitorów RSK (FMK) i p38 (SB202190) (30).

Znaczenie prognostyczne współzależności FGFR2-RSK2 w raku piersi

Kolejną częścią projektu było określenie znaczenia rokownicznego współzależności FGFR2-RSK2 w raku piersi. Analizy przeprowadzono na próbkach archiwalnych pobranych od grupy 152 chorych na raka piersi w stadium I–III leczonych w latach 1999–2009, pochodzących z Centralnego Banku Tkanek i Materiału Genetycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (31). W tkankach wykonano oznaczenie poziomu ekspresji genów *FGFR2* i *RSK2* techniką RT-qPCR oraz barwienie immunohistochemiczne w celu oznaczenia ekspresji FGFR2, RSK2 i aktywnej formy kinazy RSK (RSK-P). Analizy korelacji rang Spearmana (R) wykazały istotną statystycznie pozytywną korelację ekspresji RSK2 i FGFR2 zarówno na poziomie mRNA ($p=0,001$, $R=0,32$, $N=98$), jak i białka ($p=0,003$, $R=0,27$, $N=121$) w całej grupie chorych. Współczynnik korelacji był najwyższy w przypadku pacjentek z potrójnie-negatywnym podtypem raka piersi (TNBC) ($p=0,015$, $R=0,6$, $N=16$ oraz $p=0,005$, $R=0,55$, $N=24$ odpowiednio dla białka i mRNA) (31).

Analizy krzywych Kaplana-Meiera wykazały, że wysoki poziom RSK-P w tkance guza korelował z krótszym czasem przeżycia wolnego od nawrotu choroby (DFS) ($p=0,025$). Analizując RSK-P w połączeniu z FGFR2, wykazano, że chore z guzami pozytywnymi pod względem co najmniej jednego z tych białek (lub obu) miały znacznie wyższe ryzyko nawrotu w porównaniu z grupą „podwójnie negatywną” (nie wykazującą ekspresji FGFR2 ani RSK-P) ($p=0,01$). Co istotne, różnica między krzywymi przeżycia dwóch grup była większa w przypadku wykorzystania do analizy kom-



Ryc. 1. Schemat aktywacji RSK2 w epitelialnych i nowotworowych komórkach gruczołu piersiowego. Mechanizm zakłada, że na skutek stymulacji FGFR2 (przez FGF2) p38 pośrednio aktywuje RSK2-Tyr529, co promuje fosforylację pozostałych miejsc w obrębie kinazy przez ERK skutkując pełną aktywacją RSK2. Ścieżka FGF2/FGFR2-p38-RSK2 zaangażowana jest w migrację i adhezję komórek.

binacji dwóch czynników (FGFR2 i RSK-P) niż oznaczenia samego RSK-P. W analizie wieloczynnikowej widoczny był trend w kierunku istotności statystycznej RSK-P jako czynnika rokowniczego związanego z krótszym przeżyciem wolnym od nawrotu choroby (HR 2,577; CI 0,943-7,052; $p=0,065$) (31).

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Celem przedstawionej pracy doktorskiej była analiza wpływu współzależności FGFR2-RSK2 na progresję raka piersi. Projekt obejmował badania *in vitro* i ana-

lizy materiału klinicznego pochodzącego od chorych na raka piersi.

Wykazano, że FGFR2 reguluje aktywność kinazy RSK2 w epitelialnych i nowotworowych komórkach gruczołu piersiowego, a ścieżka sygnalizacyjna FGFR2-RSK2 stymuluje wzrost niezależny od adhezji i migrację komórek – procesy kluczowe dla progresji nowotworowej. Analizy ekspresji FGFR2 i RSK2 w guzach pochodzących od chorych na raka piersi wykazały pozytywną korelację między tymi czynnikami, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Należy podkreślić, że współczynnik korelacji był najwyższy w przypadku potrójnie-negatywnego raka piersi (TNBC) uznawanego za najbardziej agresywny i oporny na leczenie podtyp. Dodatkowo dowiedziono, iż ko-ekspresja FGFR2 i RSK-P korelowała z krótszym czasem przeżycia wolnego od objawów choroby.

Podsumowując uzyskane dane, można jednoznacznie stwierdzić, że aktywna ścieżka sygnalizacyjna

FGFR2-RSK2 związana jest z progresją raka piersi, a oba białka mogą stanowić potencjalne cele terapeutyczne w leczeniu raka gruczołu piersiowego.

Wyniki przedstawione w pracy doktorskiej zostały opublikowane w: 1) Czaplińska D et al., *Phosphorylation of RSK2 at Tyr529 by FGFR2-p38 enhances human mammary epithelial cells migration*, Biochim Biophys Acta Molecular Cell Research. 2014 Nov;1843(11):2461-70, 2) Czaplińska D et al., *Interactions between FGFR2 and RSK2-implications for breast cancer prognosis*, Tumor Biol. 2016 Oct;37(10):13721-13731, 3) Czaplińska D et al., *RSK1 promotes murine breast cancer growth and metastasis*, Folia Histochem Cytobiol. 2018;56(1):11-20.

Obrona rozprawy doktorskiej Dr Dominiki Czaplińskiej powstałej na podstawie opisanych badań odbyła się 22-02-2019 r. na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku.

PIŚMIENNICTWO

1. Romeo Y., Zhang X., Roux P.P.: Regulation and function of the RSK family of protein kinases, *Biochem J. Portland Press Limited*, 2012; 441(2): 553–69.
2. Lazar D.F., Wiese R.J., Brady M.J et al.: Mitogen-activated protein kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin, *J Biol Chem.*, 1995; 270(35): 20801–7.
3. De Cesare D., Jacquot S., Hanauer A., Sassone-Corsi P.: Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1998; 95(21): 12202–7.
4. Jin L., Li D., Lee J.S. et al.: p90 RSK2 mediates antiankist signals by both transcription-dependent and independent mechanisms, *Mol Cell Biol. American Society for Microbiology*, 2013; 33(13): 2574–85.
5. Zaru R., Ronkina N., Gaestel M. et al.: The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways, *Nat Immunol. Nature Publishing Group*, 2007; 8(11): 1227–35.
6. Kang S., Dong S., Gu T-L. et al.: FGFR3 Activates RSK2 to Mediate Hematopoietic Transformation through Tyrosine Phosphorylation of RSK2 and Activation of the MEK/ERK Pathway, *Cancer Cell.*, 2007;12(3): 201–14.
7. Kang S., Dong S., Guo A. et al.: Epidermal Growth Factor Stimulates RSK2 Activation through Activation of the MEK/ERK Pathway and Src-dependent Tyrosine Phosphorylation of RSK2 at Tyr-529, *J Biol Chem.*, 2008; 283(8): 4652–7.
8. Pan Z-Z., Devaux Y., Ray P.: Ribosomal S6 kinase as a mediator of keratinocyte growth factor-induced activation of Akt in epithelial cells, *Mol Biol Cell. American Society for Cell Biology*, 2004; 15(7): 3106–13.
9. Nadratowska-Wesołowska B., Haugsten E.M., Zakrzewska M et al.: RSK2 regulates endocytosis of FGF receptor 1 by phosphorylation on serine 7890, *Oncogene.*, 2014; 33(40): 4823–36.
10. Sulzmaier F.J., Ramos J.W.: RSK Isoforms in Cancer Cell Invasion and Metastasis, *Cancer Res.*, 2013; 73(20): 6099–105.
11. Lara R., Seckl M.J., Pardo O.E.: The p90 RSK family members: common functions and isoform specificity, *Cancer Res.*, 2013; 73(17): 5301–8.
12. Smith J.A., Poteet-Smith C.E., Xu Y. et al.: Identification of the first specific inhibitor of p90 ribosomal S6 kinase (RSK) reveals an unexpected role for RSK in cancer cell proliferation, *Cancer Res.*, 2005; 65(3): 1027–34.
13. Doehn U., Hauge C., Frank S.R. et al.: RSK Is a Principal Effector of the RAS-ERK Pathway for Eliciting a Coordinate Promotile/Invasive Gene Program and Phenotype in Epithelial Cells, *Mol Cell.*, 2009; 35(4): 511–22.
14. Kang S., Elf S., Lythgoe K. et al.: p90 ribosomal S6 kinase 2 promotes invasion and metastasis of human head and neck squamous cell carcinoma cells, *J Clin Invest.*, 2010; 120(4): 1165–77.

15. Stratford A.L., Reipas K., Hu K. et al.: Targeting p90 ribosomal S6 kinase eliminates tumor-initiating cells by inactivating Y-box binding protein-1 in triple-negative breast cancers, *Stem Cells*, 2012; 30(7): 1338–48.
16. Wesche J., Haglund K., Haugsten E.M.: Fibroblast growth factors and their receptors in cancer, *Biochem J*, 2011; 437(2): 199–213.
17. Touat M., Ileana E., Postel-Vinay S. et al.: Targeting FGFR Signaling in Cancer, *Clin Cancer Res*, 2015; 21(12): 2684–94.
18. Zhang X., Ibrahimi O.A., Olsen S.K. et al.: Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem*, 2006; 281(23): 15694–700.
19. Turner N., Grose R.: Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer*, 2010; 10(2): 116–29.
20. Greenman C., Stephens P., Smith R. et al.: Patterns of somatic mutation in human cancer genomes, *Nature*, 2007; 446(7132): 153–8.
21. Korc M., Friesel R.: The Role of Fibroblast Growth Factors in Tumor Growth, *Curr Cancer Drug Targets*, 2009; 9(5): 639–51.
22. Javerzat S., Auguste P., Bikfalvi A.: The role of fibroblast growth factors in vascular development, *Trends Mol Med*, 2002; 8(10): 483–9.
23. Lieu C., Heymach J., Overman M. et al.: Beyond VEGF: inhibition of the fibroblast growth factor pathway and antiangiogenesis, *Clin Cancer Res*, 2011; 17(19): 6130–9.
24. Hunter D.J., Kraft P., Jacobs K.B. et al.: A genome-wide association study identifies alleles in FGFR2 associated with risk of sporadic postmenopausal breast cancer, *Nat Genet*, 2007; 39(7): 870–4.
25. Turner N., Lambros M.B., Horlings H.M. et al.: Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets, *Oncogene*, 2010; 29(14): 2013–23.
26. Sun S., Jiang Y., Zhang G. et al.: Increased expression of fibroblastic growth factor receptor 2 is correlated with poor prognosis in patients with breast cancer, *J Surg Oncol*, 2012; 105(8): 773–9.
27. Kim S., Dubrovskaya A., Salamone R.J. et al.: FGFR2 Promotes Breast Tumorigenicity through Maintenance of Breast Tumor-Initiating Cells. Ahmad A, editor, *PLoS One*, 2013; 8(1): e51671.
28. Porta R., Borea R., Coelho A. et al.: FGFR a promising druggable target in cancer: Molecular biology and new drugs, *Crit Rev Oncol*, 2017; 113: 256–67.
29. Liu L., Ye T.H., Han Y.P. et al.: Reductions in Myeloid-Derived Suppressor Cells and Lung Metastases using AZD4547 Treatment of a Metastatic Murine Breast Tumor Model, *Cell Physiol Biochem*, 2014; 33(3): 633–45.
30. Czaplińska D., Turczyk L., Grudowska A. et al.: Phosphorylation of RSK2 at Tyr529 by FGFR2-p38 enhances human mammary epithelial cells migration, *Biochim Biophys Acta – Mol Cell Res*, 2014; 1843(11): 2461–70.
31. Czaplińska D., Mieczkowski K., Supernat A. et al.: Interactions between FGFR2 and RSK2-implications for breast cancer prognosis, *Tumour Biol. Springer*, 2016; 37(10): 13721–31.

WPROWADZENIE

Lore odi con cuptaea doluptaque mil incit quas veliqua sperupt asinvella sit ventur ad erita accab ipienis dolorem illici ad quisinihil ium int expedites es sae volut ant et imperovit, omnimag nimperu ptatur, enis ea que nistrum in et dio. Onseruntibus dernati onestru ntibercienis molum quid mincto ipsa de nat.

Veliquiste prerro officta turepe pro et verum estet pratur?

Ra dion reruntio quatqui velit ut ipsaeptium untem vollatem voluptaqui imilitae volum hilique reptat et reium fugiae es audicabores dolorit dolum repreni mporerit ut acilles eatur aut quos et lab ium voluptatistis aliquam eos aut verci oditemqui ut hillam fuga. Itatem et aturero con corrum dolum audit qui rem earum hit mo molorem re nobis anihili quibusame reruptatur, consequunt.

Ro illaciatume cora quia volupti nciuribus eatur? Qui verum consequere non nobitatum ra consecea nonseque aut quam, cum verum vid quatat molo que simusdae repudae comnien ecuptam re doleceatis doluptam, totatenihil et que vel estrunt quam et el laboratur, sed et perit quis expla velit et voluptatem aces modist, sum quoditatende et quam ea voluptatures anis inciati doluptiis et offictet que nossum aut di dolorest, con restiaerum litata coriorp oribercil int quat a sam es rerum nullupis dolorei cipiduciis audandi gnimolu ptaquis volutas ius non re la cor ab ipsam quia doluptatur? Ic temossed utassi con con con eliquam, quam volorum doloreste por saerferunt eligend eritas molore cus et renist libusa veritiur aceritium, que esequia spiciis ex explitas imil eum quis apicate eos enit ium nihil ipit facerib uscita non pla non pero berat.

Nam, qui ditiumquatum res inum quis santota estiumquam net plab il int aspisquid qui ipsamet pos doloritam quatemore entis pa volor as suntia voluptia quidunt plique nimolor epelit et ulla plandiae labor rescil ilitinctotas undebit asperum facerib usdantist eriaectior magnis amusam et aut restorit dolor alit odio incimol uptassita dolo deres dolent.

Fuga. Dusae nullorrum aliquie nihiligendem apid quis andios sit et lit quatem qui non porum fugit, temodisDi alit eicatem porrum vel ium qui dolorit ad minis ut aut quodit faccus, sit ellacca borecest verum ut omnis sitatis core cus et ium nihil illatem expliquodion nim sedignia dit que cor si re voloreperum recture peribus molupta ipsam, untemossus et maximet facit quam, impor aut offic te porum, eos eum serum hicipsa pienduciis eos eatia cus, quibusto idunt fu-

giaep erfero etur ature atur rercia que vid ulligendam et estius idusdam entiusam aut acideria voles modit quibus.

MATERIAŁ I METODY

Badanie zostało przeprowadzone na materiale kolejnych chorych z rozpoznaniem udaru niedokrwienego mózgu leczonych w Oddziale Udarowym Oddziału Klinicznego Neurologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie od 1 stycznia 2013 do 30 czerwca 2016 roku.

Kryterium włączenia do badania był udar niedokrwienego mózgu rozpoznawany na podstawie definicji WHO z 1976 roku [28], który wystąpił w czasie 8 godzin poprzedzających rozpoczęcie zabiegu. Do zabiegu kwalifikowano tylko osoby, u których stan funkcji poznawczych pozwalał na wyrażenie zgody na leczenie za pomocą mechanicznej trombektomii.

Każda osoba, u której zastosowano mechaniczną trombektomię, musiała spełniać kryteria włączenia do procedury i wyłączenia z niej. Protokół leczenia był zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną UJ CM (KBET/178/B/2013 z dnia 27.06.2013 roku).

Kryteria włączenia do leczenia za pomocą mechanicznej trombektomii:

- rozpoznanie ostrego udaru niedokrwienego mózgu, który jest konsekwencją zamknięcia dużego naczynia mózgowego (na podstawie angio-TK);
- czas od wystąpienia objawów neurologicznych do rozpoczęcia procedury leczenia za pomocą mechanicznej trombektomii ≤ 8 godzin u chorych na udar zlokalizowany w przednim kręgu unaczynienia, a u chorych na udar zlokalizowany w tylnym kręgu unaczynienia możliwość wykonania terapii wewnątrznacyniowej ≤ 12 godzin od wystąpienia objawów;
- deficyt neurologiczny w skali NIHSS ≥ 5 punktów;
- brak możliwości rozpoczęcia dożylnego wlewu rtPA $\leq 4,5$ godziny od wystąpienia objawów (np. przekroczenie okna czasowego lub chory w oknie czasowym, ale liczba płytek: 30 000-100 000, INR: 1,7-3, udokumentowana choroba wrzodowa przewodu pokarmowego w ciągu ostatnich 3 miesięcy, żylaki przełyku, tętniak, malformacja naczyniowa);
- brak poprawy lub zwiększenie deficytu neurologicznego po dożylnym trombolizie (brak poprawy w NIHSS w momencie zakończenia wlewu rt-PAIV);

Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji. Zeszyty Naukowe Fundacji Polpharmy to czasopismo naukowe publikujące przeglądowe i pogładowe prace naukowe powstałe na podstawie projektów badawczych finansowanych ze środków Naukowej Fundacji Polpharmy. Tematyka prac publikowanych w czasopiśmie obejmuje wiele zagadnień z zakresu medycyny i farmacji. **Celem publikacji jest prezentacja osiągnięć Autorów projektów finansowanych przez Fundację w odniesieniu do stanu wiedzy w obszarze nauki, którego dotyczył realizowany projekt.**

Skład Rady Naukowej gwarantuje wysoki poziom publikowanych prac.

Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji ukazują się raz w roku. Redakcja przyjmuje do druku artykuły w języku polskim lub angielskim, przy czym tytuł, streszczenie, słowa kluczowe i afiliacje powinny być dodatkowo napisane w języku angielskim (lub polskim w przypadku prac anglojęzycznych).

Redakcja *Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji* uznaje zasady zawarte w Deklaracji helsińskiej i w związku z tym oczekuje od autorów, aby wszelkie badania wykonane z udziałem człowieka zostały przeprowadzone zgodnie z tymi zasadami.

REGULAMIN RECENZOWANIA I PRZYJMOWANIA PRAC

Redakcja rozpatruje nadesłane prace, które zostaną uznane przez recenzentów i redaktorów za właściwe pod względem tematyki i stanowiące oryginalny wkład do postępu w nauce i/lub praktyce klinicznej lub mają pożądaną wartość dydaktyczną (szkoleniową). Podpis pierwszego autora pod oświadczeniem jest równoznaczny ze stwierdzeniem, że:

- złożona praca jest własna,
- wszyscy autorzy wyrażają zgodę na publikację przedstawionego materiału.

Otrzymany manuskrypt jest na wstępie oceniany przez zespół redakcyjny *Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji* pod względem poprawności przygotowania manuskryptu, dokumentacji fotograficznej, obecności zgody wszystkich autorów na publikację. Manuskrypty niekompletne będą zwracane autorom do uzupełnienia bez analizy merytorycznej.

Manuskrypt, co do którego nie ma uwag wstępnych, zostaje opatrzony kolejnym numerem, o którym informuje się autora korespondencyjnego. Maszynopis każdej pracy poddaje się recenzjom. Kompetentnych recenzentów wyznacza Redaktor Naczelny. Recenzenci przygotowują opinie, które zawierają uzasadnione zalecenia i sugestie poprawek i uzupełnień treści i formy artykułu. Recenzje są anonimowe.

Dyskwalifikacja nadesłanego maszynopisu wymaga dwóch negatywnych recenzji. Redaktor Naczelny zastrzega sobie prawo odmowy druku pracy zawierającej wyniki badań, w których nie

przestrzegano zasad etycznych eksperymentu klinicznego sformułowanych w Deklaracji Światowego Zgromadzenia Medycznego w Helsinkach w roku 1964, w Tokio w roku 1975 i w zaleceniach Światowej Organizacji Zdrowia w 1982 roku.

Ostateczna decyzja o przyjęciu pracy do druku lub jej odrzuceniu należy do uprawnień Rady Naukowej i nie podlega odwołaniu. Podjętych decyzji Rada Naukowa nie musi uzasadniać.

Proces recenzowania pracy nie powinien trwać dłużej niż 3-4 tygodnie, jednak Redakcja nie może zagwarantować określonego terminu podjęcia decyzji.

ZEZWOLENIA NA DRUK

Materiałom wykorzystanym z innych źródeł musi towarzyszyć pisemna zgoda pierwszego autora oraz wydawcy pierwotnej publikacji, w której materiał ten został opublikowany i w której wyrażona jest zgoda na przedruk na łamach *Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji*.

W stosunku do prac, które są w trakcie przygotowania do druku, należy uzyskać zgodę na piśmie od autorów, osoby, jak również Redakcji czasopisma, które udostępniło dane niepublikowane lub informacje ustne wykorzystywane w artykule.

POUFNOŚĆ INFORMACJI O PACJENCIE

Zmiana danych biograficznych pacjenta w celu ochrony tożsamości stanowi manipulację danych i nie powinno do niej dochodzić. Niemniej jednak autorzy prac naukowych mają obowiązek ochraniać dane osobowe pacjenta. Publikować należy wyłącznie informacje o znaczeniu naukowym lub klinicznym. W związku z tym jeżeli zawarte w artykule informacje umożliwiają w jakikolwiek sposób ustalenie tożsamości badanej osoby, autorzy muszą uzyskać pisemną zgodę tej osoby lub jej opiekuna na opublikowanie jej wyników, w tym zdjęć fotograficznych, obrazów radiologicznych i innych, przed złożeniem pracy do druku. Szczegóły dotyczące rasy, pochodzenia etnicznego, kulturowego i religii osoby badanej powinny być podane wyłącznie w przypadku, gdy zdaniem autora wywierają wpływ na przebieg choroby i/lub leczenia dyskutowanego w danym tekście.

PRAWA AUTORSKIE

Po akceptacji pracy do druku autorzy przekazują prawa autorskie Naukowej Fundacji Polpharmy. Od momentu akceptacji pracy do druku w *Postęпах Polskiej Medycyny i Farmacji* informacji w niej zawartych nie wolno ujawnić w prasie do czasu ukazania się numeru czasopisma, w którym artykuł występuje.

Po akceptacji pracy do druku złożone materiały stają się własnością Naukowej Fundacji Polpharmy i nie mogą się ukazywać w innej publikacji bez pisemnej zgody Naukowej Fundacji Polpharmy.

Za datę przyjęcia do druku uważa się datę nadesłania ostatecznej wersji artykułu. Redakcja dostarcza jeden egzemplarz czasopisma każdemu autorowi opublikowanej pracy.

ODPOWIEDZIALNOŚĆ CYWILNA

Wydawca i Rada Naukowa czynią wszelkie starania, aby zapewnić rzetelność informacji, opinii i stwierdzeń zawartych w artykule ukazującym się w *Postęпах Polskiej Medycyny i Farmacji*. Niemniej jednak za treść artykułów i reklam odpowiada wyłącznie autor, sponsor lub firma marketingowa. Zgodnie z powyższym ani Wydawca, ani Rada Naukowa, ani Naukowa Fundacja Polpharmy nie ponoszą odpowiedzialności za skutki ewentualnych nierzetelności.

Redakcja stara się zapewnić w zakresie publikacji rzetelność dawkowania leków i innych danych ilościowych. Jednakowoż Redakcja zaleca czytelnikom, aby wszystkie metody i techniki polegające na podawaniu leków opisane w *Postęпах Polskiej Medycyny i Farmacji* były stosowane wyłącznie zgodnie z instrukcjami i zaleceniami producentów leków lub sprzętu, wydanymi w kraju danego czytelnika.

KATEGORIE ARTYKUŁÓW

Redakcja *Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji* przyjmuje do druku:

- **prace przeglądowe**, tj. doniesienia przedstawiające obecny stan wiedzy na dany temat ze szczególnym uwzględnieniem bieżących kontrowersji, podejścia teoretycznego i praktycznego do zagadnienia, nierozwiązanych problemów itp., uwzględniające właściwie dobrane piśmiennictwo;
- **prace poglądowe**: opisy dotyczące ważnych zagadnień, kontrowersji i opinii w medycynie i farmacji, teksty dydaktyczne (szkoleniowe);
- **krótkie doniesienia**: opisy wybranych rozwiązań klinicznych w przypadku konkretnych problemów, ewentualnie nowe odkrycia jeszcze niepotwierdzone eksperymentalnie.

INSTRUKCJA DLA AUTORÓW

Niniejszy regulamin jest zgodny z wytycznymi opracowanymi przez Wspólny Komitet Wydawców Czasopism Biomedycznych, opublikowanymi w opracowaniu pt.: *Jednolite wymagania dotyczące prac złożonych do druku w czasopiśmie biomedycznych* (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals N Eng J Med 1997; 336: 309-15; www.acponline.org/journals/resource/unifreq.htm).

PRZYGOTOWYWANIE I NADSYŁANIE MANUSKRYPTÓW

Tekst

Manuskrypt powinien być przygotowany w dowolnej wersji Microsoft Word. Tekst należy pisać czcionką 12-punktową Times New Roman z odstępami półtorej linii między wierszami.

Tabele

Tabele można nadsyłać w dowolnej wersji edytora tekstowego Microsoft Word lub arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel.

Wykresy

Wykresy lub diagramy powinny być nadesłane w postaci plików:

- Microsoft Word (wklejone rysunki),
- prezentacji Microsoft Power Point,
- wykresów arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel,
- graficznych o rozszerzeniach *.jpg, *.gif, *.tiff.

Każdy wykres lub diagram powinien być zawarty w oddzielnym pliku. W przypadku użycia jakiegokolwiek innego oprogramowania (np. statystycznego) prosimy o kontakt z redakcją w celu uzgodnienia szczegółów dotyczących wybranego formatu wykresu.

Ryciny

Ryciny powinny być przygotowane w rozdzielczości 300 dpi lub większej w formacie *.pdf, *.eps lub *.jpeg.

Strona tytułowa

Praca powinna mieć stronę tytułową, na której znajdują się następujące informacje:

- pełny tytuł artykułu w języku polskim i angielskim,
- imię i nazwisko każdego autora (bez tytułów), jednostkę organizacyjną każdego autora (miejsce pracy),
- streszczenie w języku polskim i angielskim,
- 3-6 słów kluczowych w języku polskim i angielskim,
- imię i nazwisko, tytuł, adres, numer telefonu i/lub faksu, e-mail autora, który odpowiada za przygotowanie pracy do druku,
- źródła wsparcia materialnego w postaci grantów i dotacji, subwencji, sprzętu, leków itp.

Streszczenia

Streszczenia nie powinny przekraczać 250 słów.

W tekście pracy należy zamieścić w postaci wyodrębnionych tabel następujące zestawienia:

1. Stan wiedzy w chwili rozpoczęcia projektu;
2. Co przyniosła realizacja grantu Naukowej Fundacji Polpharmy;
3. Dalsze kierunki badań (opcjonalnie).

Przed piśmiennictwem w razie potrzeby można załączyć **podziękowania**. Podkreśla się w nich wkład wszystkich osób, które pomagały w prowadzeniu badań i które nie spełniają kryteriów włączenia do zespołu autorów, np. asystentów, techników, kierowników jednostek dających tylko ogólne wsparcie. Autorzy mają obowiązek ujawnić fakt otrzymywania wsparcia finansowego lub materialnego.

Piśmiennictwo zawiera pozycje z literatury ponumerowane w kolejności ich występowania w tekście (styl Vancouver), wybrane pod względem ważności, aktualności i dostępności. Pozycje występujące po raz pierwszy w tabelach lub rycinach należy ponumerować tak, aby utrzymać kolejność z pozycjami cytowanymi w tekście.

DOPUSZCZALNE FORMATY CYTOWANIA

We wszystkich przypadkach prosimy o zwrócenie uwagi na stosowane znaki interpunkcyjne oddzielające poszczególne pola bibliograficzne cytowanej pozycji. Źródła internetowe z racji łatwości zmian lub korekt powinny zawierać datę pobrania bądź przejrzenia pliku. Podając listę autorów, należy użyć zwrotu „i wsp.”, jeśli liczba autorów cytowanej pozycji jest wyższa niż 3.

Typowy artykuł w czasopiśmie

Lichtenstein G.R., Hanauer S.B., Sandborn W.J.: Management of Crohn's disease in adults, *Am J Gastroenterol*, 2009; 104: 465-83.

Ten sam artykuł z uwagi na pomyłki redakcyjne z opublikowaną później erratą

Koffler D., Reidenberg M.M.: Antibodies to nuclear antigens in patients treated with procainamide or acetylprocainamide [errata opublikowana w: *N Engl J Med*, 1979; 302: 322-5], *N Engl J Med*, 1979, 301: 1382-5.

Artykuł opublikowany wyłącznie elektronicznie

Drayer D.E., Koffler D.: Factors in the emergence of infectious diseases, *Emerg Infect Dis* [periodyk online], 1995, Jan-Mar [cytowany 1996.06.05]; 1(1): [24 ekrany]. Dostępny pod adresem URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Artykuł bez autora

Cancer in South Africa [tekst redakcyjny], *S Afr Med J*, 1994; 84: 15.

Monografia z określonym/określonymi autorem/autorami

Ringsven M.K., Bond D.: Gerontology and leadership skills for nurses. II wyd. Albany, Nowy Jork, Delmar Publishers, 1996.

Książka redagowana

Norman U., Redfern S.J. redd.: Mental health care for elderly people, Nowy Jork, Churchill Livingstone, 1996.

Książka wydana przez organizację

Institute of Medicine (US), Looking at the Future of the Medical Program, Waszyngton, The Institute, 1992.

Rozdział w książce

Phillips S.J., Whisnant J.R.: Hypertension and stroke, w: Laragh J.H., Brenner B.M. editors: Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management, II wyd., Nowy Jork, Raven Press, 1995, 465-78.

Materiały kongresowe

Kimura J., Shibasaki H. redd.: Recent advances in clinical neurophysiology, materiały z X Międzynarodowego Kongresu EMG i Neurofizjologii Klinicznej, 1995.10.15-19, Kioto, Japonia, Amsterdam, Elsevier, 1996.

Referat

Bengtsson S., Solheim B.G.: Enforcement of data protection, privacy and security in medical information, w: Lun K.G., Oegoulet P., Piemme T.E., Rienhoff O. redd.: MEDINFO 92, materiały z VII Światowego Kongresu nt. Informatyki Medycznej, 1992.09.6-10, Genewa, Szwajcaria.

Nie należy cytować, na ogół, abstraktów, niepublikowanych danych ani informacji ustnej. Jeżeli jednak są one niezbędne (dotyczą własnych wyników zamieszczonych w pracach będących w druku lub szykowanych do niego), można je włączyć do tekstu w odpowiednim miejscu.

TABELE I ILUSTRACJE

Tabele mają swoją numerację w kolejności występowania pierwszego odwołania w tekście oraz krótki tytuł. W nagłówkach kolumn stosuje się krótkie hasła lub skróty. Wskazany jest najprostszy możliwy układ tabeli, bez zbędnych poziomych lub pionowych linii podziału. Wyjaśnienia, w tym tłumaczenia niestandardowych skrótów, należy umieścić w przypisach pod tabelą, nie zaś w samej tabeli. Dolne przypisy pod tabelą należy ponumerować odrębnie, zaczynając od 1 dla każdej tabeli. Należy się upewnić, czy każda tabela jest wymieniona w tekście.

Należy przedstawić pomiary statystyczne odmiennie, jak np. odchylenie standardowe, standardowy błąd pomiaru średniej. Jeżeli dane pochodzą z innego źródła opublikowanego lub niepublikowanego, należy uzyskać zgodę i podać źródło w pełnym cytacie.

Ryciny i zdjęcia powinny być wykonane profesjonalnie; nie dopuszczalne są napisy ręczne. Redakcja przyjmuje ryciny i zdjęcia w formie elektronicznej w możliwie najwyższej jakości (rozdzielczość min. 300 dpi). Litera, cyfry i symbole muszą być wszędzie jasne i równomierne i mieć taki rozmiar, aby po zmniejszeniu w celu drukowania pozostały czytelne. Tytuły i wyjaśnienia należy pisać w podpisach, nie zaś na samych rycinach.

Ryciny powinny być ponumerowane w kolejności występowania pierwszego odwołania w tekście. Należy się upewnić, czy każda rycina jest wymieniona w tekście. Jeżeli dana rycina została już opublikowana, należy podać źródło i uzyskać pisemną zgodę osoby mającej prawa autorskie na przedruk materiału za wyjątkiem dokumentów stanowiących dobro publiczne. Zdjęcia mogą być kolorowe lub czarno-białe. Redakcja drukuje standardowo zdjęcia w postaci czarno-białej. Istnieje możliwość wydrukowania zdjęcia w pełnym kolorze, po konsultacji z Redakcją.

Zdjęcia mikroskopowe powinny mieć wewnętrzne oznaczenie skali. Używane w zdjęciu mikroskopowym symbole, strzałki i litery powinny być w kolorze kontrastującym z tłem. W przypadku fotografii badanych osób albo należy ukryć ich tożsamość, albo uzyskać pisemną zgodę na opublikowanie zdjęcia. Redakcja przyjmuje zdjęcia w formie elektronicznej w możliwie najwyższej jakości (rozdzielczość min. 300 dpi).

Legendy pod rycinami należy numerować cyframi arabskimi odpowiadającymi kolejnym rycinom.

Jednostki miary. Pomiary długości, wysokości, wagi i objętości powinny być podane w jednostkach metrycznych (np. metr, kilogram, litr i inne) lub w systemie dziesiętnym (np. decymetry). Temperatura musi być podana w stopniach Celsjusza. Ciśnienie tętnicze powinno być podane w milimetrach słupa rtęci. Wszystkie kliniczne pomiary hematologiczne i chemiczne powinny być podane w systemie metrycznym według Międzynarodowego Systemu Miar (SI). Alternatywne jednostki, niepocho- dzące z tego systemu, powinny być dodane w nawiasach.

Skróty i symbole. Redakcja wymaga stosowania jedynie standardowych skrótów. Nie należy używać skrótów w tytule ani w streszczeniach. Pełna wersja terminu, dla którego używa się danego skrótu, musi być podana przed pierwszym wystąpieniem skrótu w tekście za wyjątkiem standardowych jednostek miar.

WYSŁANIE ARTYKUŁU DO CZASOPISMA

Autorzy są proszeni o przesłanie manuskryptu drogą elektroniczną na adres: office@indexcopernicus.com.

Manuskryptowi powinien towarzyszyć list przewodni podpisany, w miarę możliwości, przez wszystkich autorów. List ten powinien zawierać:

1. **Oświadczenie** dotyczące statusu danej pracy, faktu, że nie była dotąd opublikowana albo że została opublikowana częściowo w innej redakcji, według wytycznych zawartych powyżej;
2. **Zaświadczenie** ujawniające istnienie ewentualnych związków finansowych (w tym informacje dotyczące np. grantu, z podaniem źródła i numeru grantu) lub powiązań mogących budzić zastrzeżenia;
3. **Oświadczenie**, że wszyscy autorzy czytali i potwierdzili, że określone powyżej wymagania dotyczące współautorstwa zgodnie z powyższym zostały spełnione oraz że każdy autor uważa, że złożony tekst stanowi rzetelną pracę wszystkich wymienionych autorów;
4. **Dane personalne, adres i telefony głównego autora**, który odpowiada za porozumiewanie się z pozostałymi autorami w sprawach dotyczących ewentualnych korekt i końcowego zatwierdzenia „szczotki” autorskiej do druku (jeżeli autor nie poda odrębnego adresu do korespondencji dla czytelników, adres ten zostanie wydrukowany na końcu opublikowanej pracy jako „adres do korespondencji”).

Należy załączyć również zgody na przedruki opublikowanych materiałów, na wykorzystanie reprodukcji publikowanych materiałów, na użycie zdjęć lub podawanie danych o osobach, których tożsamość można ustalić, oraz zgody na imienne wyróżnienie osób za ich wkład.

Redakcja *Postępów Polskiej Medycyny i Farmacji* uważa ww. warunki za spełnione, jeżeli złożony zostanie podpis pierwszego autora.

KOMPLET MATERIAŁÓW NALEŻY PRZESŁAĆ DO REDAKCJI NA ADRES:

Index Copernicus sp. z o.o.

Postępy Polskiej Medycyny i Farmacji

ul. Kasprzaka 31A/184, 01-234 Warszawa

tel.: +48 22 487 53 93

e-mail: office@indexcopernicus.com

Jesteśmy jednym z narodowych czempionów gospodarczych i największym polskim producentem leków. Wpływamy na rozwój polskiej gospodarki w oparciu o wiedzę i innowacyjne technologie. Naszym mottem jest hasło „Ludzie pomagają Ludziom”. Od ponad 80 lat cieszymy się zaufaniem lekarzy, farmaceutów i pacjentów, wytwarzając leki wysokiej jakości, bezpieczne i skuteczne.



Jesteśmy dumni z naszego rozwoju

- Jesteśmy liderem polskiego rynku farmaceutycznego.
- Dynamicznie rozwijamy się w regionie Europy Środkowo-Wschodniej i Azji Centralnej.
- Zatrudniamy ok. 7500 pracowników w Polsce i za granicą.
- Od 2000 r. zainwestowaliśmy ponad 1,5 mld zł w badania i rozwój – najwięcej w polskiej farmacji.
- Przeznaczyliśmy ok. 20 mln zł na rozwój polskiej nauki i działalność Naukowej Fundacji Polpharmy.
- Wdrażamy najlepsze praktyki społecznej odpowiedzialności biznesu.



NAUKOWA
FUNDACJA
POLPHARMY

www.polpharma.pl/fundacja