

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
ANATOMICZNE

POLSKIE  
TOWARZYSTWO  
BIOLOGII  
KOMÓRKI

POLISH  
ANATOMICAL  
SOCIETY

POLISH SOCIETY  
FOR CELL  
BIOLOGY

VOL. 29, ISSUE 4/2002  
(531-688)

*Vol. 29, 2002*  
**Postępy  
Biologii  
Komórki**

**Advances  
in Cell  
Biology**

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Szczepan BILIŃSKI – biologia rozwoju, embriologia, cytoskielet, połączenia międzykomórkowe – developmental biology, embryology, cytoskeleton, cell junctions – *Inst. Zoologii UJ, 30-060 Kraków, Ingardena 6*

Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – *Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*

Bożena KAMIŃSKA – neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology – *Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*

Jerzy KAWIAK – immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*

Wincenty KILARSKI – mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maria OLSZEWSKA – komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – plant cells, genetic information in plant and animal cells – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*

Barbara PŁYTYCZ – immunologia – immunology – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Maciej ZABEL – histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry (immunocytochemistry, hybridocytochemistry), cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chatubińskiego 6a*

Jan ŻEROMSKI – patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry – *Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49*

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Mieczysław CHORAŹY, Leszek CIECIURA, Antoni HORST, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 8340 344, fax 8340470, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl.

@ Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

## W TYM ZESZYCIE PBK

- Cyklooksygenazy są enzymami katalizującymi przemianę fosfolipidów błony komórkowej, prowadzące do powstania prostanoidów – prostaglandyn i tromboksanów. Prostaglandyny kontrolują różne procesy fizjologiczne m.in. przebieg odpowiedzi zapalnej. Temu poświęcony jest artykuł na stronie 533. W części drugiej tego artykułu (str. 555) opisano wpływ niesteroidowych leków przeciwzapalnych będących inhibitorami cyklooksygenaz. Tam też znajdziemy historię odkrycia i nazwy aspiryny.
- Układy komunikacji w roślinach stanowią plazmodesmy, kanały cytoplazmatyczne łączące komórki. Tymi kanałami przekazywane są cząsteczki sygnalizacyjne (str. 627). Jednak w komórkach roślin funkcjonują, podobnie jak w komórkach zwierzęcych, układy transdukcji sygnałów przez błonę komórkową w układzie ligand-receptor i kaskady kinaz białkowych (str. 595).
- Jednym z przekaźników sygnałów komórkowych u ssaków jest tlenek azotu (NO). Jest on również produkowany w roślinach przez enzymy o aktywności podobnej do syntaz tlenku azotu ssaków. Tlenek azotu bierze udział w procesach obronnych roślin, jak i regulacji niektórych procesów morfogenetycznych (str. 613).

## 2018-2019

The following table shows the results of the survey conducted in 2018-2019. The data is presented in a clear and concise manner, allowing for easy comparison and analysis. The results are as follows:

Category	Value
Category 1	12.5%
Category 2	18.7%
Category 3	25.3%
Category 4	31.9%
Category 5	38.6%

The data indicates a steady increase in the values across the categories, with Category 5 showing the highest percentage at 38.6%. This suggests a strong trend in the data being analyzed.

## CYKLOOKSYGENAZY I. ROLA W ODCZYNIĘ ZAPALNYM <sup>1</sup>

### CYCLOOXYGENASES I. ROLE IN INFLAMMATION

Elżbieta KOŁACZKOWSKA\*

Zakład Immunobiologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński

**Streszczenie:** Cyklooksygenazy są enzymami katalizującymi przemianę fosfolipidów błony komórkowej, prowadzące do powstawania prostanoidów obejmujących prostaglandyny i tromboksany. Prostaglandyny kontrolują różnorodne procesy fizjologiczne, takie jak: ochrona przewodu pokarmowego, prawidłowe funkcjonowanie nerek, procesy rozrodcze i przebieg odczynu zapalnego. Obecnie wiadomo, iż cyklooksygenaza (COX) występuje w co najmniej dwóch izoformach kodowanych przez geny zlokalizowane na różnych chromosomach. Istotne różnice pomiędzy odmianami COX obserwuje się także na poziomie mRNA, ale struktura białek obu izoform jest bardzo zbliżona, z podobną aktywnością katalityczną. Cyklooksygenaza-1 (COX-1) bierze udział zarówno w utrzymaniu homeostazy organizmu w prawidłowych warunkach, jak i we wczesnych etapach odczynu zapalnego (0–1 godzina). Z kolei cyklooksygenaza-2 (COX-2) jest zaangażowana w późniejszych etapach reakcji zapalnej (> 1 godzina), kiedy dochodzi do rozwoju odpowiedzi immunologicznej. Najnowsze badania dowodzą również, iż COX-2 uczestniczy w procesie wygaszania odpowiedzi zapalnej poprzez produkcję prostaglandyn cyklopentanowych z serii J (metabolity PGD<sub>2</sub>), np. 15-deoxy-Δ<sup>12</sup>,<sup>14</sup>PGJ<sub>2</sub>. Prostaglandyny te mają właściwości przeciwzapalne dzięki zdolności do aktywacji receptorów jądrowych PPAR-γ i/lub hamowania aktywności czynnika transkrypcyjnego NFκB. Próba wyjaśnienia tych przeciwstawnych aktywności COX-2 doprowadziła do wysunięcia hipotezy, iż prozapalną aktywność należy przypisać COX-2, ale właściwości przeciwzapalne – trzeciej odmianie cyklooksygenazy (COX-3). Hipotetyczna COX-3 byłaby strukturalnie zbliżona do COX-2, być może nawet kodowana przez ten sam gen, gdyż jej aktywność była blokowana przez selektywne inhibitory COX-2. Implikacje tego faktu w leczeniu stanów zapalnych są dyskutowane w części II niniejszego artykułu.

**Słowa kluczowe:** zapalenie – COX – syntaza prostaglandyn G/H – prostaglandyny – modele zwierzęce

**Abstract:** Cyclooxygenases are enzymes involved in an enzymatic pathway for membrane phospholipid derivatives, leading to formation of prostanoids i.e. prostaglandins and thromboxanes. Prostaglandins control different physiological processes such as protection of gastrointestinal integrity, renal func-

<sup>1</sup>Praca finansowana z DS/ZIE/IZ/UJ/2002.

\*Elżbieta Kołaczowska jest stypendystką Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej.

tions, reproduction, and course of inflammation. Cyclooxygenase exists in at least two isoforms encoded by different genes that are located on different chromosomes. Significant differences between the isoforms are also observed on mRNA level but both enzymes have a similar primary protein structure and carry out an identical catalytic activity. Cyclooxygenase-1 (COX-1) is involved both, in homeostatic control of the body in normal conditions, and in the early stage of inflammation (0–1 hour). On the other hand, cyclooxygenase-2 (COX-2) participates in subsequent stages of inflammation (>1 hour) during the onset of inflammatory reaction. Recent studies, however, reveal that COX-2 is also involved in the resolution of inflammation since its activity produces cyclopentenone prostaglandins of the J-series (PGD<sub>2</sub> metabolites), e.g. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ<sub>2</sub>. These prostaglandins possess anti-inflammatory properties as they activate the nuclear receptor PPAR- $\gamma$  and/or inhibit nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B). In order to explain these contradictory activities of COX-2 a hypothesis was postulated that proinflammatory activity should be attributed to COX-2 but the anti-inflammatory properties to the third isomer of COX (COX-3). Putative COX-3 could be structurally similar to COX-2, maybe even encoded by the same gene since its activity can be blocked by selective COX-2 inhibitors. Implications of this fact for treatment of inflammatory diseases are discussed in part II of this article.

*Key words:* inflammation – COX – prostaglandin G/H synthase – prostaglandins – animal models

*„Im bardziej coś studiujemy, tym bardziej odkrywamy naszą ignorancję”.*

*Percy Bysshe Shelley*

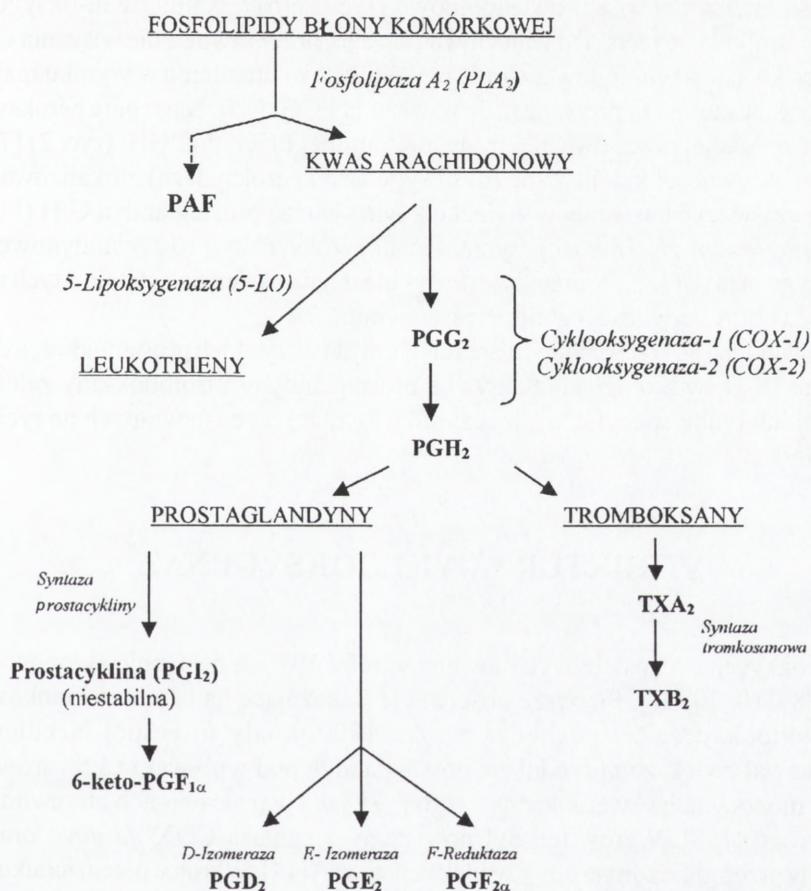
## WPROWADZENIE

Cyklooksyzgenazy (COX) są enzymami odgrywającym kluczową rolę zarówno w procesach fizjologicznych, jak i w stanach patologicznych, związaną z działalnością prostaglandyn będących produktami ich aktywności katalitycznej. Duże zainteresowanie cyklooksyzgenazą w ostatnich latach wiąże się z odkryciem jej dwóch odmian (izoforn): COX-1 i COX-2 [15, 38, 45, 76, 83]. Wykazano, iż odmiany te pełnią zróżnicowane funkcje w procesach utrzymania homeostazy organizmu i w czasie stanów chorobowych. W przebiegu odczynu zapalnego ważną rolę prozapalną odgrywają zarówno COX-1, jak i COX-2, choć izoforny te wydają się kontrolować różne etapy procesu zapalnego [9, 23, 38, 85, 86]. Ostatnio odkryto nową, przeciwzapalną aktywność cyklooksyzgenazy, co pozwoliło na postawienie hipotezy wskazującej na istnienie trzeciej izoforny COX [85].

## SZLAK ENZYMATYCZNY PRZEMIANY FOSFOLIPIDÓW BŁONY KOMÓRKOWEJ W EIKOZANOIDY I PAF

Proces przemiany fosfolipidów błony komórkowej rozpoczyna aktywacja cytoplazmatycznej fosfolipazy A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>). Aktywację tę może wywołać wzrost

poziomu wewnątrzkomórkowych jonów wapnia ( $[Ca^{2+}]$ ) w cytoplazmie [22], lecz możliwe są również alternatywne sposoby aktywacji, niezależne od jonów wapnia [65]. W wyniku aktywacji cPLA<sub>2</sub> dochodzi do jej przemieszczenia do otoczki jądrowej lub siateczki śródplazmatycznej [65]. Aktywna fosfolipaza A<sub>2</sub> tnie każdą cząsteczkę fosfolipidu w taki sposób, iż powstają dwa typy związków. Większa część służy jako substrat w syntezie czynnika aktywującego płytki krwi (PAF; ang. *platelets activating factor*), natomiast mniejszym produktem jest najczęściej kwas arachidonowy (kwas 5,8,11,14-eikozatetraenowy) – wielonienasycony kwas tłuszczowy, który może ulec dalszym przemianom wiodącym do powstania dwóch głównych typów eikozanoidów: prostanoidów i leukotrienów [55] (ryc. 1).



RYCINA 1. Szlak enzymatyczny przemiany fosfolipidów błony komórkowej w eikozanoidy i czynnik aktywujący płytki krwi (PAF); pogrubione – eikozanoidy i PAF, kursywa – enzymy

W przypadku aktywności 5-lipoksygenazy kwas arachidonowy ulega dalszemu przekształceniu w leukotrieny, natomiast aktywne cząsteczki cyklooksygenazy powodują jego przemianę w prostanoidy: prostaglandyny i tromboksany [29]. Spośród wielonienasyconych kwasów tłuszczowych preferowanym substratem dla cyklooksygenazy jest kwas arachidonowy. Jednak również kwas homo- $\gamma$ -linolenowy i w mniejszym stopniu kwas eikozapentaenowy mogą ulec przemianom w prostanoidy [69]. W sposób schematyczny szlak przemian enzymatycznych fosfolipidów błony komórkowej przedstawiony jest na rycinie 1.

### Podwójna aktywność katalityczna cyklooksygenazy

Cyklooksygenaza katalizuje przemianę wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (np. kwasu arachidonowego) dwustopniowo (ryc. 2) [61]. Najpierw di-oksigenaza powoduje zamknięcie pierścienia pięciowęglowego, przez utworzenie wiązania C-C w cząsteczce kwasu arachidonowego oraz powoduje jego utlenienie w wyniku reakcji z dwoma cząsteczkami  $O_2$ , prowadząc do powstania  $PGG_2$  [75]. Następnie peroksydaza powoduje redukcję, przez dwa elektrony, niestabilnej  $PGG_2$  do  $PGH_2$  (ryc. 2) [75].

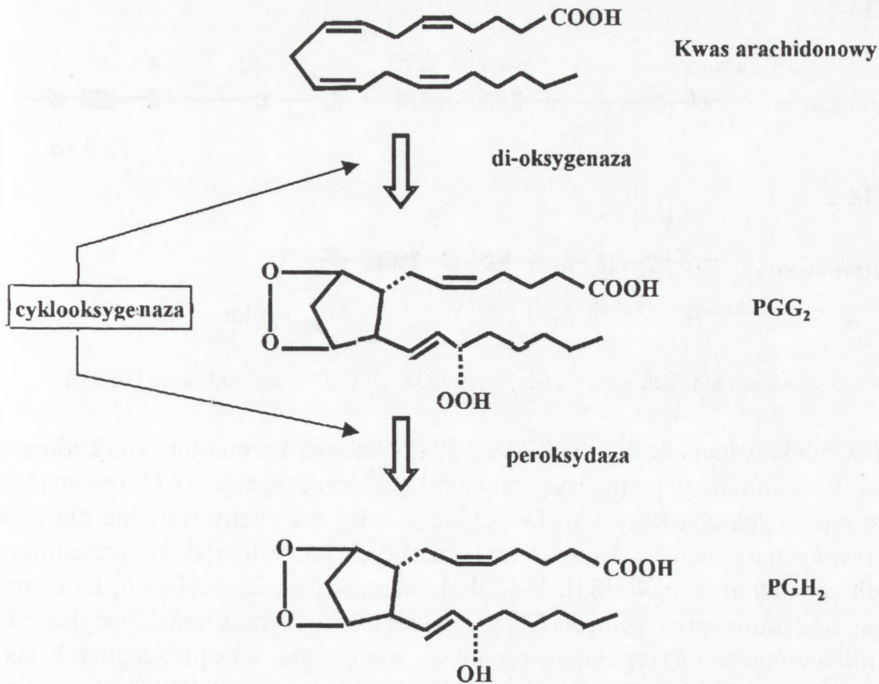
Obie te aktywności katalityczne (di-oksigenaza i peroksydaza) zlokalizowane są na jednej cząsteczce nazwanej w związku z tym syntazą prostaglandyn G/H (PGHS; ang. *prostaglandin H synthase*), syntazą endoperoksydazy prostaglandynowej lub cyklooksygenazą (COX). W niniejszym artykule używana będzie ostatnia z tych nazw, określająca obie aktywności katalityczne enzymu.

Prostaglandyna  $H_2$  jest wspólnym prekursorem dla wszystkich prostanoidów, a dalsza przemiana  $PGH_2$  w biologicznie aktywne prostaglandyny i tromboksany zależy od obecności lub braku specyficznych enzymów (syntaz) przedstawionych na rycinie 1 [15, 29, 69].

## STRUKTURA CYKLOOKSYGENAZ

Cyklooksygenaza została wyizolowana w roku 1976, a następnie sklonowana w roku 1988 [10, 30, 38]. Pierwsze obserwacje wskazujące na istnienie indukowanej formy cyklooksygenazy pochodzą z roku 1990, kiedy to zespół Needlemana zaobserwował zwiększoną produkcję prostaglandyn pod wpływem LPS zarówno w ludzkich monocytach w warunkach *in vitro* [17], jak i w makrofagach otrzewnowych myszy *in vivo* [58]. Wzrost ten był powiązany z syntezą COX *de novo* oraz był hamowany przez glikokortykosterydy (deksametazon) [17]. Wkrótce potem indukowana odmiana cyklooksygenazy została nazwana COX-2 [76]. Stwierdzono, iż jest ona kodowana przez inny gen niż dotychczas scharakteryzowana odmiana, nazywana od tego momentu COX-1. Cyklooksygenaza-2 została następnie sklonowana [45, 87]. Obecnie obie odmiany są dobrze scharakteryzowane, zarówno strukturalnie jak i funkcjonalnie.



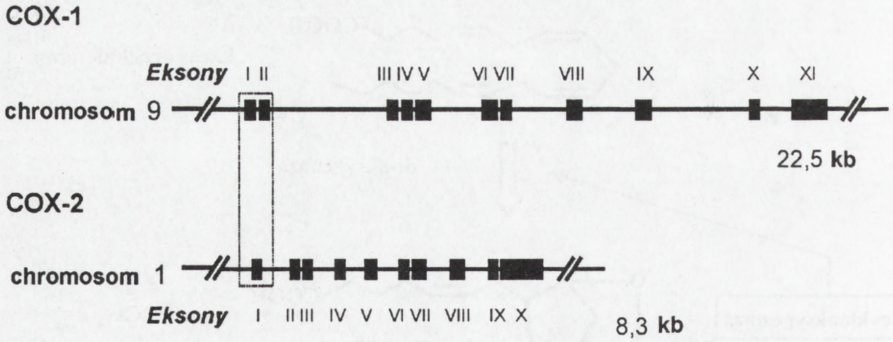


RYCINA 2. Podwójna aktywność katalityczna cyklooksygenazy: dwustopniowa przemiana kwasu arachidonowego w prekursora prostanoidów, prostoglandynę H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>)

### Budowa genów kodujących COX-1 i COX-2 oraz ich promotory

Na poziomie genów obserwuje się istotne różnice między odmianami cyklooksygenazy poczynając od faktu, iż są one zlokalizowane na różnych chromosomach (patrz ryc. 3) [42]. Gen kodujący COX-1 składa się z 11 eksonów i 10 intronów o łącznej długości 22,5 kilobaz, podczas gdy gen kodujący COX-2 jest znacznie mniejszy (8,3 kb) (ryc. 3) [30, 42]. Różnica w wielkości genów wynika z braku jednego eksonu w genie kodującym COX-2 (ekson 1 i 2 obecne w genie dla COX-1 uległy tu fuzji) oraz z faktu, iż introny genu kodującego COX-2 są mniejsze [30, 83]. Mały rozmiar genu kodującego COX-2 powiązany jest z tym, iż ulega on gwałtownej transkrypcji i obróbce postranskrypcyjnej [10]. Cechy te są charakterystyczne dla genów odpowiedzi pierwotnej (ang. *primary response genes*) [31]. Mimo to z rozmiarem 8,3 kilobaz, gen kodujący COX-2 jest jednym z największych genów w tej grupie [30].

Istotne różnice pomiędzy cyklooksygenazami dotyczą również promotorów kodujących je genów (ryc. 4). Podstawowa różnica dotyczy braku sekwencji TATA w strukturze genu dla COX-1 [88]. Cecha ta jest charakterystyczna dla genów typu *housekeeping*, tj. takich, których produkty są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu w warunkach fizjologicznych [10]. Nie zaobserwowano

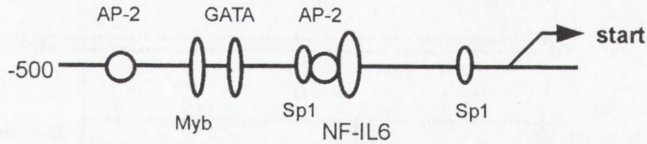
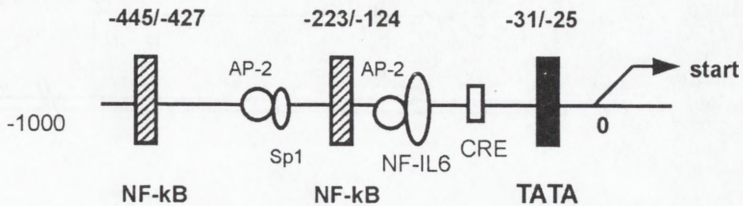


RYCINA 3. Struktura ludzkich genów kodujących COX-1 i COX-2 (na podstawie [10,83])

również indukowanej transkrypcji COX-1 [74]. Natomiast promotor genu kodującego COX-2 (65% homologii pomiędzy gatunkami) zawiera sekwencję TATA i pewną liczbę miejsc wiążących elementy transkrypcyjne, a więc ma cechy wspólne dla genów indukowanych o zmiennej ekspresji, zwłaszcza tych, których produkty uczestniczą w stanach zapalnych (ryc. 4) [83]. Wśród elementów transkrypcyjnych, które mogą związać się z promotorem genu dla COX-2, wyróżniamy czynnik transkrypcyjny NFκB (ang. *nuclear factor κB*) regulujący produkcję wielu czynników prozapalnych, takich jak cytokiny (np. TNF-α, IL-1β, -6, -8, i INF-γ) i tlenek azotu (NO) [3], oraz czynnik jądrowy interleukiny 6 (ang. *nuclear factor of IL-6*), CRE (ang. *cyclic AMP response element binding protein*) [30, 75, 76, 83]. Miejsce działania jednego z czynników transkrypcyjnych, octanu mirystynianu forbolu (TPA; ang. *12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate = triphorbol myristate acetate*), zlokalizowane jest wewnątrz eksonu 1 [42]. Aktywność wszystkich tych czynników transkrypcyjnych związana jest z przebiegiem odczynu zapalnego i wiąże się bezpośrednio z głównym mechanizmem zwiększającym ekspresję COX-2 w trakcie zapalenia [75]. Wykazano, iż wewnątrzkomórkowy sygnał prowadzący do transkrypcji COX-2 może być przekazany za pośrednictwem różnych dróg, w tym poprzez aktywację szlaku kinazy białkowej A, kinazy białkowej C (estry forbolu), fosfatazy, kinazy tyrozynowej oraz w wyniku transformacji wirusowej (*src*) [75, 76].

### Różnice pomiędzy izoformami COX na poziomie mRNA i białka

Transkrypcja COX-1 i 2 prowadzi do powstania mRNA o rozmiarach odpowiednio, 2,8 i 4,5 kilobaz (ryc. 5) [30]. Transkrypt COX-2 jest niestabilny, co jest powiązane z obecnością na końcu 3' trzech sygnałów poliadenylacji oraz długiego, niepodlegającego translacji regionu zawierającego 17 kopii „sekwencji niestabilności RNA” (AUUUA) zwanej sekwencją Shawn-Kamensa [83]. Uważa się, iż sekwencje te przyczyniają się do gwałtownej degradacji transkryptu, a niezmienność w mysich i ludzkich genach kodujących COX-2 wskazuje na ich ważną rolę [10, 83]. W przypadku COX-1 zaobserwowano tworzenie się różnych odmian alternatywnego zespłania

**Promotor COX-1****Promotor COX-2**

RYCINA 4. Promotory ludzkich genów kodujących COX-1 i COX-2 (na podstawie [10,75])

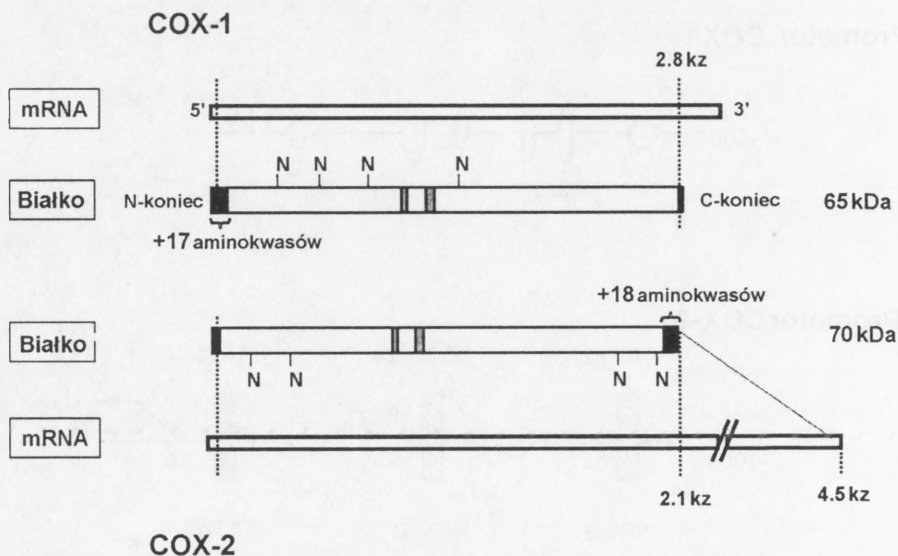
(ang. *splice variants*) z pierwotnego transkryptu jako rezultat stymulacji przez TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , estry forbolu i surowicę [83]. Obserwowano także alternatywne składanie mRNA dla COX-2 w wyniku np. stymulacji mitogenem [87].

Pomimo zasadniczych różnic na poziomie DNA i RNA, struktura białek COX-1 i 2 jest zaskakująco podobna (ryc. 5). Częsteczka cyklooksygenazy-2 ma wielkość 70 kDa, a COX-1 jest tylko nieco mniejsza, z masą 65 kDa [74]. Oba białka mają cztery miejsca N-glikozylacji i dwa bardzo konserwatywne obszary z identyczną sekwencją aminokwasów [10]. Białka wykazują 75% homologii. Również domeny katalityczne są bardzo konserwatywne [83]. Dwie główne różnice dotyczą I-rzędowej struktury aminokwasów. Na N-końcu COX-2 jest nieco krótsza, o 17 aminokwasów, a na końcu z wolną grupą karboksylową znajduje się 18 dodatkowych aminokwasów nieobecnych w strukturze COX-1 [45] (ryc. 5).

Cyklooksygenazy są homodimerami zarówno pod względem struktury, jak i funkcji. Każdy monomer składa się z trzech strukturalnych domen: domeny homologicznej do czynnika wzrostu naskórka (ang. *epidermal growth factor*), sąsiadującej z nią domeny wiążącej się z błoną (ang. *membrane binding domain*) i dużej, C-końcowej, globularnej domeny katalitycznej (ang. *globular catalytic domain*) [46].

### Centra katalityczne cyklooksygenaz

Każda cząsteczka COX ma centrum katalityczne di-oksigenazy i peroksydazy, połączone ze sobą funkcjonalnie i strukturalnie. Centrum katalityczne di-oksigenazy



RYCINA 5. Struktura mRNA i białka COX-1 i COX-2 u ludzi [83, zmodyfikowane]

zlokalizowane jest w rdzeniu enzymu, w kanale hydrofobowym, a centrum katalityczne peroksydazy znajduje się w pobliżu powierzchni cząsteczki [75]. Aktywność katalityczna peroksydazy jest niezależna od aktywności di-oksigenazy, ale nie odwrotnie, jak pokazano w warunkach *in vitro* [43].

**Di-oksigenaza.** Centra aktywności katalitycznej di-oksigenazy izoformy-1 i 2 mają podobną budowę, mechanizm katalityczny, kinetykę reakcji i dają podobne produkty [75]. Niemniej istnieją dwie różnice w strukturze di-oksigenaz o ważnych konsekwencjach farmakologicznych i biologicznych. Po pierwsze, miejsce aktywności katalitycznej COX-2 jest większe i bardziej elastyczne [56]. Ta różnica została praktycznie wykorzystana przy syntezie selektywnych inhibitorów COX-2 (porównaj w części II: *Selektywne inhibitory cyklooksygenazy-2*). Ponadto, przy niskim stężeniu kwasu arachidonowego w COX-1, ale nie COX-2, oba centra katalityczne w homodimerze COX hamują wzajemnie swoją aktywność (allosteryzm) [75]. Dzięki temu zjawisku, przy równoczesnej ekspresji obu izoform, COX-2 ma większe szanse skutecznie współzawodniczyć o uwolniony kwas arachidonowy z COX-1.

**Peroksydaza.** Budowa miejsc katalitycznych peroksydazy w cząsteczkach obu izoform COX jest podobna do struktury centrów katalitycznych pozostałych peroksydaz hemowych [47]. Ponadto, reakcja katalizowana przez peroksydazy COX-1 i -2 przebiega z udziałem związków pośrednich I i II charakterystycznych dla tego typu enzymów [47, 53]. Istnieją dwie różnice dotyczące centrów katalitycznych peroksydazy pomiędzy izoformami. COX-1 katalizuje prawie wyłącznie dwuelektronową redukcję substratu, podczas gdy COX-2 katalizuje 60% reakcji przy udziale dwóch elektronów,

a pozostałe przez jeden elektron [47]. Z kolei w przypadku COX-2 szybkość powstawania związku pośredniego II z I jest większa niż w przypadku COX-1 [53].

Ilość, a także rodzaj produktów tworzonych w oksydacyjno-redukcyjnych reakcjach katalizowanych przez LO i COX silnie zależy od wewnątrzkomórkowego potencjału redoks [13]. Aktywacja katalityczna COX wymaga obecności pewnej ilości nadtlenu wodoru lub nadtlenoazotynu (ang. *peroxynitrite*, ONOO<sup>-</sup>), produktu reakcji NO z anionem ponadtlenkowym (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) [56]. Kompleksy ferryl-oxo, produkty reakcji nadtlenuazotynu z żelazem schelatowanym w hemowych grupach prostetycznych COX, reagują z tyrozyną w centrum katalitycznym utleniając ją do rodnika tyrozynowego [26]. Rodnik ten inicjuje cyklooksygenację odszczepiając stereoselektywnie wodór w pozycji 13S kwasu arachidonowego [56].

## FUNKCJA COX-1 I COX-2 : PODOBIENSTWA I RÓŻNICE

Jak już wspomniano, obie cyklooksygenazy mają podobną aktywność katalityczną oraz bardzo podobną strukturę białek [19, 39]. Różnią się natomiast stabilnością mRNA oraz wykorzystaniem substratu (kw. arachidonowego) pochodzącego z różnych źródeł [67]. Przez dłuższy czas za podstawową różnicę pomiędzy izoformami uważano fakt, iż ekspresja COX-1 jest konstytutywna, tj. zachodzi w sposób ciągły zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w stanach chorobowych, podczas gdy ekspresja COX-2 jest indukowana podczas stanów patologicznych. Obecnie wiemy, iż istnieje wiele wyjątków od tej reguły, np. konstytutywną ekspresję COX-2 wykryto w tkankach nowotworowych [54, 62], ale także w normalnych komórkach śródbłonna naczyniowego [59, 89], mięśniach gładkich, osteoblastach i komórkach mezangialnych [61]. Stała ekspresja COX-2 zachodzi również w niektórych narządach, np. w mózgu, nerkach [15] i w macicy oraz błonach płodowych w trakcie ciąży [72, 73]. Z drugiej strony w pewnych przypadkach może zachodzić indukowana ekspresja COX-1. Pokazano, iż indukcja COX-1 towarzyszyła różnicowaniu się ludzkiej linii białaczki monocytowej wywołanej przez ester forbolu, a czynnik komórki macierzystej (SCF, ang. *stem cell factor*) i deksametazon wywołały ekspresję COX-1 w mastocytach pozyskanych ze szpiku kostnego myszy [23]. W warunkach *in vivo* ekspresja COX-1 może być indukowana w śródbłonku naczyń tętniczych macicy w trakcie ciąży [34, 36].

Konstytutywna ekspresja COX-1 związana jest z jej rolą w prawidłowym przebiegu niektórych procesów fizjologicznych, a więc w utrzymaniu homeostazy organizmu [15, 76]. Z drugiej strony ciągła gotowość do produkcji PG, będąca konsekwencją konstytutywnej ekspresji COX-1, odgrywa również ważną rolę w pierwszej fazie stanu zapalnego umożliwiając natychmiastową produkcję prostaglandyn. Natomiast ekspresja COX-2 może być wywołana przez liczną grupę bodźców zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych, które związane są z rozwojem odpowiedzi immunologicznej. Do czynników indukujących ekspresję COX-2 należą lipopolisacharyd [17], forskolina,

IL-1, TNF- $\alpha$ , surowica, czynnik wzrostu naskórka (EGF), transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), czynnik aktywujący płytki krwi (PAF) [10, 83]. Generalnie więc w odpowiedzi na specyficzny bodziec zewnętrzny może dojść do natychmiastowej (minuty do godziny) lub opóźnionej (godziny) produkcji prostaglandyn w zależności od tego, czy jest katalizowana odpowiednio przez COX-1 czy COX-2 [49].

Izoformy różnią się też lokalizacją wewnątrz komórki, gdyż COX-1 funkcjonuje głównie w siateczce śródplazmatycznej (ER), podczas gdy COX-2 jest obecny zarówno w ER, jak i w osłonce jądrowej [10, 83]. Fakt, iż izoformy są zlokalizowane w różnych przedziałach komórkowych, wskazuje na to, że ich produkty również mogą mieć różne miejsce działania, a to mogłoby być jednym z powodów wyjaśniających, dlaczego enzym ten istnieje w dwóch odmianach [83]. Innym takim powodem może być fakt, iż COX-1 zużywa kwas arachidonowy pochodzący spoza komórki (np. uwalniany w trakcie degranulacji mastocytów), a COX-2 katalizuje przemianę endogennego kwasu arachidonowego [30].

Podczas zapalenia lub innych stanów patologicznych ekspresja COX-1 zwiększa się maksymalnie 2–3-krotnie w odróżnieniu od dwudziestokrotnie nasilonej ekspresji COX-2 [83].

## PROSTAGLANDYNY JAKO PRODUKTY CYKLOOKSYGENAZY

Prostanoidy będące produktami aktywności katalitycznej cyklooksygenazy, obejmują prostaglandyny (PG) i tromboksany (TX) i w odróżnieniu od pozostałych eikosanoidów zawierają dodatkowy pierścień pięciowęglowy, od którego odchodzą dwa łańcuchy boczne,  $\alpha$  i  $\omega$ , połączone z pierścieniem przy C<sub>8</sub> i C<sub>12</sub> [69]. Zdolność do produkcji prostanoidów ma większość typów komórek kręgowców, a prostaglandyny zostały wyizolowane nawet z tak prostych organizmów jak jamochłony [15].

Prostaglandyny zostały odkryte w latach trzydziestych XX wieku w związku z obserwacją, iż ludzki płyn nasienny zawiera substancję lipidową powodującą obniżenie ciśnienia krwi [55, 69]. Autorzy odkrycia sądzili, iż czynnik ten jest produkowany przez gruczoł krokowy (prostata) i dlatego nazwali go prostaglandyną. W odróżnieniu od hormonów rozprawdzanych systemowo poprzez układ krążenia do narządów docelowych, w których zlokalizowane są ich specyficzne receptory [38], PG przekazują sygnał lokalnie. Sygnał ten przekazywany jest albo w sposób parakryny na sąsiednie komórki lub autokrynowo, czyli na te same komórki, które je wyprodukowały [38]. Krótki zasięg sygnału jest konsekwencją krótkiego biologicznego półtrwania prostaglandyn (w przypadku niektórych PG wynosi on mniej niż 1 minuta) oraz faktu, iż wszystkie PG są szybko metabolizowane [69]. Eikozanoidy działają poprzez specyficzne receptory metabotropowe, mające siedem hydrofobowych domen

transbłonowych, kooperujące z białkami G (R7G) [11, 33]. W przypadku prostanoidów wyróżniamy sześć głównych typów receptorów: TP, IP, EP, FP, DP, odpowiednio dla ich głównych ligandów TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> i PGD<sub>2</sub>; oraz cztery podtypy receptorów dla PGE<sub>2</sub> (EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub>, EP<sub>4</sub>) [63]. Szczegółowa rola prostaglandyn jest przedstawiona w następujących podrozdziałach. Natomiast główna rola pozostałych prostanoidów, czyli tromboksanów związana jest z procesem krzepnięcia krwi. Tromboksan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) ma silne właściwości powodujące agregację płytek krwi oraz skurcze naczyń krwionośnych [38], a jego akcja jest hamowana przez prostacyklinę (PGI<sub>2</sub>), jedną z najbardziej aktywnych naczyniowo prostaglandyn [61, 69].

### Rola prostaglandyn w utrzymaniu homeostazy organizmu

Prostaglandyny regulują wiele z podstawowych procesów fizjologicznych w zróżnicowanych układach. W układzie pokarmowym regulują funkcje wydzielnicze poprzez stymulację produkcji śluzu i hamowanie wydzielania kwasów, a także kontrolują ruchy gastryczne [15, 30]. Rola prostaglandyn w nerkach dotyczy modulacji przepływu krwi oraz kontroli gospodarki wodno-elektrolitowej [28]. Ich obecność jest również ważna dla prawidłowego rozwoju mózgu, a prostaglandyna D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) odgrywa ważną rolę w czasie snu [15, 30]. W przypadku układu rozrodczego prostaglandyny kontrolują niemal każdy przebiegający tam proces, uczestnicząc w migracji plemników, owulacji, luteinizacji, zapłodnieniu, zagnieżdżeniu się embrionu w macicy i w rozwoju płodu. Wreszcie prostaglandyny odgrywają ważną rolę w czasie samego porodu powodując skurcze macicy [30]. Ponadto prostaglandyny mogą powodować zarówno zwężenie światła oskrzeli (PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, PGG<sub>2</sub>), jak i jego rozszerzenie (PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>), co wskazuje na ich rolę w procesie oddychania [15, 30]. W poprzednim paragrafie omówiono przeciwwakrzepowe właściwości prostaglandyn i ich przeciwstawną funkcję w stosunku do tromboksanów.

### Rola prostaglandyn w stanie zapalnym i innych stanach chorobowych

Prostaglandyny odgrywają kluczową rolę w procesach patofizjologicznych, takich jak: stany zapalne [25, 29, 61], choroby nowotworowe [16, 20] czy choroba Alzheimera [32]. W przypadku stanów zapalnych działanie prostaglandyn wywołuje symptomy odpowiadające wszystkim czterem głównym oznakom zapalenia opisanym przez Celsusa (30 p.n.e.–38 n. e.) [55]. Powodując skurcze mięśni gładkich naczyń krwionośnych i/lub zwiększając przepływ krwi (co prowadzi do rozszerzenia naczyń), prostaglandyny powodują wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych [6, 29]. Przejawia się to zaczerwienieniem (*rubor*) oraz powstaniem obrzęku (*tumor*) w ognisku zapalnym. Ponadto prostaglandyny powodują lokalne podwyższenie temperatury (*calor*) [8], a działając na lokalne zakończenia nerwowe indukują ból (*dolor*) [29]. Wszystkie te objawy prowadzą do zaburzenia funkcji narządu (Galen: *functio laesa*), zjawiska charakterystycznego dla procesów chorobowych. Głównymi prostaglandynami zaangażowanymi w proces zapalny są PGE<sub>2</sub> i prostacyklina, ale jest również obserwowany udział PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> i 6-keto-PGF<sub>1α</sub> [69]. Należy wspomnieć, iż w

przebiegu procesu zapalnego ważną rolę odgrywają także inne czynniki lipidowe, które mogą przejawiać aktywność przeciwstawną lub podobną do prostaglandyn. Niektóre czynniki lipidowe, np. PAF i leukotrieny cysteinowe, przejawiają aktywność synergistyczną z PG. Wraz z innymi czynnikami aktywnymi naczyniowo (histamina, kininami) eikozanoidy te powodują wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych. Niektóre przejawy działalności prostaglandyn są zjawiskami złożonymi, na przykład aktywne naczyniowo prostaglandyny ( $PGE_2$  i  $PGI_2$ ) nie wywołują bezpośredniego tworzenia obrzęku w miejscu zapalnym. Zjawisko to tłumaczy hipoteza „dwóch mediatorów”, zgodnie z którą  $PGE_2$  i prostacyklina pośredniczą w tworzeniu się obrzęku w sposób pośredni, współdziałając z drugą grupą mediatorów. Najpierw histamina i bradykinina powodują wzrost przepuszczalności naczyń, który prowadzi do wycieku osocza. Wyciek ten jest następnie potęgowany przez  $PGE_2$  i  $PGI_2$  poprzez zwiększenie przepływu krwi [69, 84]. Również w przypadku zjawiska bólu  $PGE_2$  i prostacyklina działają, najprawdopodobniej, na zasadzie mechanizmu potęgującego akcję histaminy i bradykininy poprzez uwrażliwianie zakończeń nerwów bólowych [69].

Korelację pomiędzy gwałtownym wzrostem syntezy prostaglandyn a rozwojem choroby wykazano w przypadku takich stanów chorobowych, jak: astma, reumatoidalne zapalenie stawów (też zapalenie stawów i kości), zapalenie jelit i okrężnicy, a także w powiązaniu z procesem resorpcji kości [38]. Zwiększoną produkcję prostaglandyn obserwowano również w trakcie niektórych chorób nowotworowych, a zwłaszcza w przebiegu nowotworów jelit. Szczegóły roli PG i cyklooksygenaz(y) w tym aspekcie są przedmiotem artykułów przeglądowych w Postęпах Biologii Komórki [37, 44] oraz w czasopismach anglojęzycznych [16, 20, 80]. Prawdopodobnie najlepszym wskaźnikiem znaczenia prostaglandyn w przebiegu stanów chorobowych jest powszechne i skuteczne leczenie pacjentów poprzez podawanie inhibitorów cyklooksygenazy. Charakterystyka i mechanizm działania poszczególnych klas inhibitorów jest przedmiotem części II niniejszego artykułu. Dla poniższych dywagacji istotne będzie, iż inhibitory aktywności cyklooksygenaz najogólniej dzielimy na nieselektywne, hamujące zarówno COX-1 i COX-2, oraz selektywne, hamujące aktywność tylko jednej z izoform [51, 52, 81].

## MYSZY Z NIEAKTYWNYMI GENAMI KODUJĄCYMI COX-1 LUB COX-2

Istotnych danych dotyczących roli poszczególnych izoform w procesach fizjo(pat)ologicznych dostarczyły badania przeprowadzone na myszach genetycznie zmodyfikowanych, z nieaktywnymi, w wyniku manipulacji DNA (*gene-targeting*), genami kodującymi cyklooksygenazę (ang. *COX knockout mice*) [48, 49]. U myszy tych nie obserwowano ani powstawania transkryptu, ani białka dla odpowiednich izoform. U myszy będących heterozygotami, RNA i białko COX-1 lub COX-2 osiągało



ekspresję odpowiadającą 50% poziomu obecnego u myszy kontrolnych (ang. *wild-type mice*) z dzikimi (aktywnymi) genami dla odpowiednich odmian COX [48, 49, 60].

Myszy z nieaktywnym genem dla COX-1 (*cox-1<sup>-</sup>/cox-2<sup>+</sup>*) rodziły się bez komplikacji, a długość ich życia była normalna. Pomimo iż w większości tkanek poziom prostaglandyn był obniżony o 99% w stosunku do poziomu u myszy kontrolnych, nie odnotowano u nich rozwoju żadnej patologii [49, 50]. Wyniki te były dużym zaskoczeniem, gdyż poddały w wątpliwość dogmat o roli COX-1 w utrzymaniu homeostazy organizmu (*housekeeping*). Co ciekawe nie zaobserwowano też kompensacyjnego zwiększenia aktywności COX-2 w warunkach fizjologicznych. Być może ewentualny mechanizm kompensacyjny działa za pośrednictwem innych niż PG czynników, np. tlenu azotu (porównaj w części II: *Niesteroidowe Leki Przeciwzapalne uwalniające tlenek azotu (NO-NSAIDs)*). Najważniejsze powikłania odnotowane u myszy *cox-1<sup>-</sup>/cox-2<sup>+</sup>*, dotyczyły trudności z porodem następnego pokolenia oraz tego, iż potomstwo to rodziło się martwe albo umierało wkrótce po narodzinach [48, 50]. [69].

W przeciwieństwie do myszy *cox-1<sup>-</sup>/cox-2<sup>+</sup>*, u zwierząt z nieaktywnym genem dla COX-2 (*cox-1<sup>+</sup>/cox-2<sup>-</sup>*) odnotowano wiele patologii [48, 49]. Zaledwie 60% nowonarodzonych myszy *cox-1<sup>+</sup>/cox-2<sup>-</sup>* przeżyło po odstawieniu od pokarmu matki, a spośród nich tylko 75% dożyło jednego roku [12, 14]. Dotychczas nie poznano przyczyny śmierci przed upływem trzech tygodni życia, a późniejsze zgony były związane z rozwojem zapalenia otrzewnej lub nieprawidłowym funkcjonowaniem nerek. Ponadto samice *cox-1<sup>+</sup>/cox-2<sup>-</sup>* były prawie całkowicie sterylne [14], a u wszystkich myszy obserwowano nieprawidłowości w funkcjonowaniu nerek, które pogłębiały się wraz z wiekiem [14, 60].

## PROZAPALNA AKTYWNOŚĆ CYKLOOKSYGENAZY-1 I CYKLOOKSYGENAZY-2

Próbując wyjaśnić rolę poszczególnych izoform w procesie zapalnym, u myszy z nieaktywnymi genami kodującymi cyklooksygenazy wywołano stan zapalny ucha przez podanie kwasu arachidonowego [50, 60]. Zaobserwowano, iż u myszy *cox-1<sup>-</sup>/cox-2<sup>+</sup>* obrzęk ucha został zahamowany o 70% w stosunku do tegoż u myszy kontrolnych. U heterozygot COX-1 odpowiedź zapalna miała natężenie pośrednie pomiędzy myszami *cox-1<sup>-</sup>/cox-2<sup>+</sup>* a zwierzętami kontrolnymi [49, 50]. Sugeruje to rolę COX-1, ale nie COX-2, na tym etapie procesu zapalnego. Ponadto, podanie octanu mirystynianu forbolu wywołało podobną reakcję zapalną zarówno u myszy z nieaktywnym genem kodującym COX-1, COX-2, jak i u myszy kontrolnych [50, 60]. Obserwacja ta była niespodziewana, gdyż octan mirystynianu forbolu indukuje ekspresję COX-2 (porównaj w *Budowa genów kodujących COX-1 i COX-2 oraz ich promotory*), co wskazywałoby na rolę izoformy-2 w reakcji zapalnej na ten związek [49]. Ponieważ myszy *cox-1<sup>+</sup>/cox-2<sup>-</sup>* mają normalną ekspresję COX-1, możliwe jest,

iż sama izoforma-1 jest odpowiedzialna za produkcję prostaglandyn w takiej ilości, która umożliwia normalny przebieg reakcji zapalnej [48, 49]. Rola COX-1 w powstawaniu obrzęku została również pokazana w trakcie zapalenia łapy myszy wywołanego przez podanie karrageniny (wielocukier z roślin morskich) [25]. Tylko nieselektywny inhibitor COX (indometacyna) zahamował powstanie obrzęku zarówno u myszy *cox-1<sup>+</sup>/cox-2<sup>-</sup>*, jak i zwierząt kontrolnych wskazując na rolę COX-1 w tym procesie [23, 25]. Wczesne etapy odczynu zapalnego związane z powstaniem obrzęku są konsekwencją zwiększonej przepuszczalności lokalnych naczyń krwionośnych, prowadzącej do wysięku osocza do tkanek [55]. W naszych badaniach wykorzystujących mysz model zapalenia otrzewnej wywołanego przez podanie zymosanu (wielocukrowy składnik ściany drożdży *Saccharomyces cerevisiae*) wykazaliśmy, iż nieselektywny inhibitor cyklooksygenaz (indometacyna), w odróżnieniu od inhibitorów selektywnych dla COX-2 (NS-398, nimesulid), zahamował wzrost przepuszczalności naczyń w jamie otrzewnej [41]. Ponadto w punkcie czasowym korelującym z maksymalnym zwiększeniem przepuszczalności naczyń (pół godziny po wywołaniu zapalenia [40]), zaobserwowaliśmy tylko ekspresję genu kodującego COX-1. Natomiast ekspresja genu dla COX-2 nastąpiła po upływie 1 godziny i nie uległa zmianie na dalszych etapach odczynu zapalnego (przynajmniej do jego szóstej godziny) [41]. Wszystkie powyższe wyniki wskazują na główną rolę COX-1 we wczesnych etapach odczynu zapalnego związanych z wysiękiem osocza i powstaniem obrzęku. Zjawiska te zachodzą na tak wczesnych etapach odczynu zapalnego (minuty do jednej godziny), iż wykluczają możliwość zajścia ekspresji genu kodującego COX-2, jego transkrypcji i translacji, co może tłumaczyć udział COX-1 w tych procesach. Z drugiej strony cyklooksygenaza-1 ma podobną aktywność katalityczną jak COX-2, co pozwala na produkcję tych samych prostaglandyn [83].

Opublikowano również prace, które wskazują na rolę COX-2 w powyższych procesach. Seibert i wsp. [70] pracujący na modelu odczynu zapalnego wywołanego przez podanie karrageniny do podskórnych torebek powietrznych utworzonych uprzednio na grzbiecie myszy (ang. *air pouch model*), zaobserwował, iż selektywny inhibitor COX-2 (SC-58125) zahamował powstanie wysięku w ognisku zapalnym. Jednak użyta dawka SC-58125 była 100-krotnie większa niż potrzebna do zahamowania produkcji prostaglandyn, podczas gdy lek ten wykazuje 100-krotnie większą selektywność dla COX-2 niż COX-1 *in vitro* [66]. Możliwe jest więc, iż użyta dawka SC-58125 zahamowała również aktywność COX-1 [23]. Z kolei Katori i zespół [27, 38] pracujący na modelu odczynu zapalnego opłucnej indukowanego przez podanie karrageniny wykazali korelację czasową pomiędzy ekspresją i aktywnością COX-2 a procesem wysięku osocza do jamy opłucnej [27]. Podanie selektywnego inhibitora COX-1 (aspiryna) oraz selektywnych inhibitorów COX-2 (nimesulid, SC-58125) spowodowało zahamowanie wysięku osocza [27]. Wyniki te wskazują na udział obu izoform w procesie zwiększonej przepuszczalności naczyniowej, przy czym należy podkreślić, iż w badanym modelu maksymalny wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych obserwuje się dopiero w pięć godzin od podania karrageniny (czyli bardzo późno) [38].

Jedne z pierwszych doniesień dotyczących roli cyklooksygenazy-2 w procesach zapalnych wskazywały na jej indukowaną i przejściową ekspresję w komórkach wysiękowych, zarówno w czasie ostrego [79] jak i chronicznego [82] odczynu zapalnego. We wspomnianym już modelu odczynu zapalnego opłucnej indukowanym przez podanie karrageniny, szczyt ekspresji i aktywności COX-2 i produkcji PGE<sub>2</sub> przypada po dwóch godzinach od podania irytanta, równocześnie z napływem neutrofilii (leukocytów wielopłatkowojądrzastych; PMN, ang. *polymorphonuclear leukocytes*), przy czym ekspresja COX-2 jest obserwowana zarówno w PMN, jak i w fagocytach jednojądrzastych (monocytach/makrofagach) [79]. W tym czasie nieselektywne i selektywne inhibitory COX-2 hamowały reakcję zapalną, podczas gdy w szóstej godzinie stanu zapalnego efekt taki wywoływały tylko nieselektywne inhibitory COX [25]. Ta zaskakująca obserwacja wskazuje na to, iż na tym etapie główną izoformą odpowiedzialną za utrzymanie odpowiedzi zapalnej była COX-1.

Odczyn zapalny wywołany przez podanie karrageniny do podskórnych torebek powietrznych utworzonych na grzbiecie myszy również doprowadził do indukcji COX-2 i produkcji PGE<sub>2</sub>, których źródłem były wysiękowe makrofagi i komórki wyścielające wewnętrzną powierzchnię torebek powietrznych [57]. Podanie deksametazonu spowodowało zahamowanie ekspresji COX-2 i produkcji PG, a podanie selektywnych (NS-398) i nieselektywnych (indometacyna) inhibitorów COX-2, zablokowanie syntezy prozapalnych PG [57].

Również dożylnie podanie LPS (lipopolisacharyd) szczurom wywołało ekspresję COX-2 w komórkach aorty i leukocytach krwi [18]. Dodatkowa dożylna aplikacja kwasu arachidonowego doprowadziła do produkcji 6-keto-PGF<sub>1α</sub>, PGE<sub>2</sub> i TXB<sub>2</sub>, która była hamowana przez podanie selektywnego inhibitora COX-2 (NS-398) [18].

Cyklooksygenaza-2 jest także zaangażowana w przebieg chronicznych odczynów zapalnych. Podczas reumatoidalnego zapalenia stawów wywołanego przez podanie adjuwanta (*Mycobacterium butyricum* w oleju mineralnym) wykazano indukcję mRNA i powstanie białka COX-2 w powiązaniu z powstawaniem obrzęku i syntezą PG w stawach [2]. Podanie selektywnego inhibitora tej izoformy (SC-58125) zahamowało powyższe objawy zapalenia. Podobnych obserwacji dokonano po podaniu oleju krotonowego w kompletnym adjuwancie Freund'a do torebek powietrznych na grzbiecie myszy [82], a także w modelu powracającego zapalenia alergicznego [64].

## PRZECIWPALNA AKTYWNOŚĆ CYKLOOKSYGENAZY: COX-2 CZY COX-3?

W serii ostatnich artykułów dotyczących charakterystyki modelu odczynu zapalnego opłucnej, indukowanego u myszy przez podanie karrageniny, grupa pod kierunkiem prof. Willoughby zaobserwowała dwie fazy ekspresji cyklooksygenazy-2 [23–25, 86].

Pierwsza, wczesna faza ekspresji i aktywności COX-2 została wykryta w dwie godziny od podania irytanta i była połączona z rozwojem odczynu zapalnego, napływem neutrofilii i produkcją prozapalnej PGE<sub>2</sub> [24, 25]. Na tym etapie zarówno selektywne, jak i nieselektywne inhibitory COX blokowały reakcję zapalną. Po upływie 48 godzin od podania karrageniny ponownie obserwowano wzrost aktywności COX-2. Druga faza aktywności tej izoformy była znacznie silniejsza niż poprzednia i była połączona z procesem wygaszania odczynu zapalnego i późnym napływem makrofagów. Nie towarzyszyła jej produkcja prostaglandyn prozapalnych. Podanie selektywnych inhibitorów COX-2, w przeciwieństwie do nieselektywnych, po 24 do 48 godzin od podania irytanta prowadziło do wydłużenia zapalenia, czyli następowało zahamowanie procesu wygaszania odczynu zapalnego [24]. Autorzy zasugerowali, iż powtórna ekspresja COX-2 ma miejsce w makrofagach napływających do ogniska zapalnego, w których cyklooksigenaza preferencyjnie indukuje syntezę przeciwzapalnych prostaglandyn, takich jak: PGD<sub>2</sub> i jej metabolity, prostaglandyny cyklopentanowe z serii J, np. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ<sub>2</sub> [9, 23, 86]. Prostaglandyny te działają albo na sąsiadujące komórki, albo w sposób autokryny na komórki macierzyste powodując aktywację receptorów PPAR- $\gamma$  i/lub hamując aktywność czynnika transkrypcyjnego NF $\kappa$ B [35, 68, 71]. Oba z tych procesów prowadzą do zahamowania ekspresji i aktywności cytokin prozapalnych i indukowanej syntazy tlenku azotu (iNOS), a w konsekwencji do wygaszenia stanu zapalnego. Związane jest to z faktem, iż receptory PPAR (ang. *peroxisome proliferator activated receptor*) tworzą heterodimery z receptorem RXR (ang. *retinoid X receptor*), a powstały kompleks wiąże się z PPRE (ang. *peroxisome proliferator response elements*) kontrolującymi ekspresję wielu genów [21]. Z kolei czynnik transkrypcyjny NF $\kappa$ B bezpośrednio reguluje aktywację wielu czynników prozapalnych, w tym cytokin i tlenku azotu (porównaj w *Budowa genów kodujących COX-1 i COX-2 oraz ich promotory*) [3]. Pokazano w szczególności, iż 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ<sub>2</sub> powoduje zahamowanie ekspresji genów zależnych od NF $\kappa$ B poprzez mechanizm kowalencyjnej modyfikacji kluczowych cystein w kinazie I $\kappa$ B (aktywującej I $\kappa$ B – inhibitor NF $\kappa$ B) i w domenach podjednostek NF $\kappa$ B wiążących się z DNA [77]. Niedawno wykazano, iż inhibicja produkcji czynników prozapalnych może być konsekwencją nie tylko zahamowania oddziaływań NF $\kappa$ B-DNA, ale i fizycznych interakcji pomiędzy NF $\kappa$ B i PPAR- $\gamma$  [7].

W mysim modelu odczynu zapalnego opłucnej indukowanym przez podanie karrageniny, PGD<sub>2</sub> i 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ<sub>2</sub> zostały wykryte w płynie wysiękowym zarówno na wczesnych, jak i na późniejszych etapach zapalenia. Wydaje się jednak prawdopodobnym, iż na wczesnych etapach reakcji zapalnej aktywność przeciwzapalnych PG była maskowana przez aktywność PGE<sub>2</sub> o właściwościach prozapalnych [24].

Z powyższych obserwacji wynika więc, iż w czasie odczynu zapalnego opłucnej wywołanego przez podanie karrageniny, COX-2 odgrywa dwie przeciwstawne role. Próba wyjaśnienia tego „funkcjonalnego zamieszania” doprowadziła do postawienia hipotezy, iż prozapalną aktywność należy rzeczywiście przypisać COX-2, ale właś-

ciwości przeciwwzapalne – trzeciej odmianie cyklooksygenazy [5, 85]. Hipotetyczna COX-3 byłaby strukturalnie zbliżona do COX-2, być może nawet kodowana przez ten sam gen, ale poddana innej obróbce na poziomie RNA, na co wskazuje fakt, iż jej aktywność była blokowana przez selektywne inhibitory COX-2 [85]. Zgodnie z tą hipotezą ekspresja/aktywność poszczególnych odmian cyklooksygenazy zmieniałyby się w przebiegu odczynu zapalnego, przynajmniej w tym modelu, w zależności od jego etapu (porównaj tab. 1).

Dane wskazujące na istnienie trzeciej odmiany cyklooksygenazy pochodzą również z badań nad paracetamolem, który w świetle powyższej hipotezy byłby pierwszym poznany inhibitorem COX-3 [4, 5]. Zagadnienie to jest omówione w części II niniejszej pracy.

TABELA 1. Ekspresja i dominująca aktywność izoform cyklooksygenazy (COX) na różnych etapach odczynu zapalnego na przykładzie zapalenia opłucnej wywołanego przez podanie karrageniny [21–23]; „-” – brak ekspresji/brak aktywności, „+” – zajęcie ekspresji/natężenie aktywności (+ < +++).

Izoforma Zapalenie	EKSPRESJA			AKTYWNOŚĆ		
	COX-1	COX-2	COX-3	COX-1	COX-2	COX-3
Brak	+	-	-	+++	-	-
Wczesne etapy (0-1 h)	+	-/+	-	+++	-	-
Rozwój odczynu	+	+	-/-	+	+++	-/-
Kulminacja	+	+	-	+++	+	-
Wygaszanie	+	?	+	+	+/?	+++

## PODSUMOWANIE

Istnienie co najmniej dwóch cząsteczek o identycznej aktywności katalitycznej, ale o zróżnicowanej ekspresji (konstytutywna/indukowana) jest zjawiskiem poznaczonym stosunkowo niedawno, ale nie odosobnionym (porównaj: syntaza tlenu azotu [1, 78]). W przypadku cyklooksygenazy każda z jej odmian odgrywa istotną rolę w przebiegu odczynu zapalnego, różną jednak na poszczególnych jego etapach. Cyklooksygenaza-1 z racji swej konstytutywnej ekspresji jest gotowa do rozpoczęcia produkcji prostanoïdów natychmiast po otrzymaniu sygnału aktywacji, natomiast cyklooksygenaza-2 i hipotetyczna cyklooksygenaza-3 włączają się na późniejszych etapach rozwoju i przebiegu reakcji zapalnej. Jednak ekspresja i aktywność cyklooksygenazy-1 nie ulegają w tym czasie zmianie. Ostatnie badania wskazują, iż cyklooksygenaza, poprzez produkcję prostaglandyn przeciwzapalnych, rozpoczyna/włącza się również w proces wygaszania procesu zapalnego. Prace eksperymentalne muszą jeszcze potwierdzić, czy za ten przejaw aktywności cyklooksygenazy jest odpowiedzialna kolejna izoforma tego enzymu, cyklooksygenaza-3.

## PODZIĘKOWANIA

Dziękuję wszystkim współpracownikom, zarówno w Krakowie jak i w Tromsø, (Norwegia), za krytyczne komentarze i pomocne sugestie w trakcie przygotowań wykładu na obronę mojej pracy doktorskiej, na którym oparty jest niniejszy artykuł.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ALDERTON WK, COOPER CE, KNOWLES RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; **357**: 593–615.
- [2] ANDERSON GD, HAUSER SD, MCGARITY KL, BREMER ME, ISAKSON PC, GREGORY SA. Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis. *J Clin Invest* 1996; **97**: 2672–2679.
- [3] BARNES PJ. Nuclear factor-kappa B. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; **29**: 867–870.
- [4] BOTTING R. Paracetamol-inhibitable COX-2. *J Physiol Pharmacol* 2000; **51**: 609–618.
- [5] BOTTING RM. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? *Clin Infect Dis* 2000; **31**: S202–210.
- [6] BUSSE WW. Leukotrienes and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **157**: S210–213; discussion S247–218.
- [7] CHUNG SW, KANG BY, KIM SH, PAK YK, CHO D, TRINCHIERI G, KIM TS. Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 2000; **275**: 32681–32687.
- [8] COCEANI F, AKARSU ES. Prostaglandin E2 in the pathogenesis of fever. An update. *Ann N Y Acad Sci* 1998; **856**: 76–82.
- [9] COLVILLE-NASH PR, GILROY DW. COX-2 and the cyclopentenone prostaglandins – a new chapter in the book of inflammation? *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2000; **62**: 33–43.

- [10] CROFFORD LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol* 1997; **24**: 15–19.
- [11] DAHLEN SE. Pharmacological characterization of leukotriene receptors. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**: S41–45.
- [12] DAVIS BJ, LENNARD DE, LEE CA, TIANO HF, MORHAM SG, WETSEL WC, LANGENBACH R. An ovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta. *Endocrinology* 1999; **140**: 2685–2695.
- [13] DEAN AM, DEAN FM. Carbocations in the synthesis of prostaglandins by the cyclooxygenase of PGH synthase? A radical departure! *Protein Sci* 1999; **8**: 1087–1098.
- [14] DINCHUK JE, CAR BD, FOCHT RJ, JOHNSTON JJ, JAFFEE BD, COVINGTON MB, CONTEL NR, ENG VM, COLLINS RJ, CZERNIAK PM, GORRY SA, TRZASKOS JM. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 1995; **378**: 406–409.
- [15] DUBOIS RN, ABRAMSON SB, CROFFORD L, GUPTA RA, SIMON LS, VAN DE PUTTE LB, LIPSKY PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; **12**: 1063–1073.
- [16] FOSSLIEN E. Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 2001; **31**: 325–348.
- [17] FU JY, MASFERRER JL, SEIBERT K, RAZ A, NEEDLEMAN P. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 1990; **265**: 16737–16740.
- [18] FUTAKI N, TAKAHASHI S, KITAGAWA T, YAMAKAWA Y, TANAKA M, HIGUCHI S. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by NS-398 in endotoxin shock rats *in vivo*. *Inflamm Res* 1997; **46**: 496–502.
- [19] GARAVITO RM, DEWITT DL. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1441**: 278–287.
- [20] GATELY S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000; **19**: 19–27.
- [21] GELMAN L, FRUCHART JC, AUWERX J. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol Life Sci* 1999; **55**: 932–943.
- [22] GIJON MA, LESLIE CC. Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A2 activation. *J Leukoc Biol* 1999; **65**: 330–336.
- [23] GILROY DW, COLVILLE-NASH PR. New insights into the role of COX 2 in inflammation. *J Mol Med* 2000; **78**: 121–129.
- [24] GILROY DW, COLVILLE-NASH PR, WILLIS D, CHIVERS J, PAUL-CLARK MJ, WILLOUGHBY DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999; **5**: 698–701.
- [25] GILROY DW, TOMLINSON A, WILLOUGHBY DA. Differential effects of inhibitors of cyclooxygenase (cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2) in acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 1998; **355**: 211–217.
- [26] GOODWIN DC, ROWLINSON SW, MARNETT LJ. Substitution of tyrosine for the proximal histidine ligand to the heme of prostaglandin endoperoxide synthase 2: implications for the mechanism of cyclooxygenase activation and catalysis. *Biochemistry* 2000; **39**: 5422–5432.
- [27] HARADA Y, HATANAKA K, KAWAMURA M, SAITO M, OGINO M, MAJIMA M, OHNO T, OGINO K, YAMAMOTO K, TAKETANI Y, YAMAMOTO S, KATORI M. Role of prostaglandin H synthase-2 in prostaglandin E2 formation in rat carrageenin-induced pleurisy. *Prostaglandins* 1996; **51**: 19–33.
- [28] HARRIS RC, WANG JL, CHENG HF, ZHANG MZ, MCKANNA JA. Prostaglandins in macula densa function. *Kidney Int Suppl* 1998; **67**: S49–52.
- [29] HELLER A, KOCH T, SCHMECK J, VAN ACKERN K. Lipid mediators in inflammatory disorders. *Drugs* 1998; **55**: 487–496.
- [30] HERSCHMAN HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1299**: 125–140.
- [31] HERSCHMAN HR, KUJUBU DA, FLETCHER BS, MA Q, VARNUM BC, GILBERT RS, REDDY ST. The tis genes, primary response genes induced by growth factors and tumor promoters in 3T3 cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1994; **47**: 113–148.
- [32] HULL M, LIEB K, FIEBICH BL. Anti-inflammatory drugs: a hope for Alzheimer's disease? *Expert Opin Investig Drugs* 2000; **9**: 671–683.
- [33] ISHII S, SHIMIZU T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* 2000; **39**: 41–82.
- [34] JANOWIAK MA, MAGNESS RR, HABERMEHL DA, BIRD IM. Pregnancy increases ovine uterine artery endothelial cyclooxygenase-1 expression. *Endocrinology* 1998; **139**: 765–771.

- [35] JIANG C, TING AT, SEED B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; **391**: 82–86.
- [36] JUN SS, CHEN Z, PACE MC, SHAUL PW. Estrogen upregulates cyclooxygenase-1 gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelium. *J Clin Invest* 1998; **102**: 176–183.
- [37] KAMINSKI R, KOZAR K, GOLAB J. Cyklooksyzgenazy, niesteroidalne leki przeciwwzpalne i raki jelita grubego – część I. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 651–666.
- [38] KATORI M, MAJIMA M. Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm Res* 2000; **49**: 367–392.
- [39] KIEFER JR, PAWLITZ JL, MORELAND KT, STEGEMAN RA, HOOD WF, GIERSE JK, STEVENS AM, GOODWIN DC, ROWLINSON SW, MARNETT LJ, STALLINGS WC, KURUMBAIL RG. Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. *Nature* 2000; **405**: 97–101.
- [40] KOŁACZKOWSKA E, SELJELID R, PLYTYCZ B. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. *J Leukoc Biol* 2001; **69**: 33–42.
- [41] KOŁACZKOWSKA E, SHAHZIDI S, SELJELID R, VAN ROOIJEN N, PLYTYCZ B. Early vascular permeability in murine experimental peritonitis is co-mediated by resident peritoneal macrophages and mast cells: crucial involvement of macrophage-derived cysteinyl-leukotrienes. *Inflammation* 2002; **26**: 61–71.
- [42] KOSAKA T, MIYATA A, IHARA H, HARA S, SUGIMOTO T, TAKEDA O, TAKAHASHI E, TANABE T. Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* 1994; **221**: 889–897.
- [43] KOSHKIN V, DUNFORD HB. Coupling of the peroxidase and cyclooxygenase reactions of prostaglandin H synthase. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1430**: 341–348.
- [44] KOZAR K, KAMINSKI R, GOLAB J. Cyklooksyzgenazy, niesteroidalne leki przeciwwzpalne i raki jelita grubego – część II. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 667–683.
- [45] KUJUBU DA, FLETCHER BS, VARNUM BC, LIM RW, HERSCHMAN HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 1991; **266**: 12866–12872.
- [46] KURUMBAIL RG, STEVENS AM, GIERSE JK, MCDONALD JJ, STEGEMAN RA, PAK JY, GILDEHAUS D, MIYASHIRO JM, PENNING TD, SEIBERT K, ISAKSON PC, STALLINGS WC. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 1996; **384**: 644–648.
- [47] LANDINO LM, CREWS BC, GIERSE JK, HAUSER SD, MARNETT LJ. Mutational analysis of the role of the distal histidine and glutamine residues of prostaglandin-endoperoxide synthase-2 in peroxidase catalysis, hydroperoxide reduction, and cyclooxygenase activation. *J Biol Chem* 1997; **272**: 21565–21574.
- [48] LANGENBACH R, LOFTIN C, LEE C, TIANO H. Cyclooxygenase knockout mice: models for elucidating isoform-specific functions. *Biochem Pharmacol* 1999; **58**: 1237–1246.
- [49] LANGENBACH R, LOFTIN CD, LEE C, TIANO H. Cyclooxygenase-deficient mice. A summary of their characteristics and susceptibilities to inflammation and carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1999; **889**: 52–61.
- [50] LANGENBACH R, MORHAM SG, TIANO HF, LOFTIN CD, GHANAYEM BI, CHULADA PC, MAHLER JF, LEE CA, GOULDING EH, KLUCKMAN KD, KIM HS, SMITHIES O. Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 1995; **83**: 483–492.
- [51] LIPSKY LP, ABRAMSON SB, CROFFORD L, DUBOIS RN, SIMON LS, VAN DE PUTTE LB. The classification of cyclooxygenase inhibitors. *J Rheumatol* 1998; **25**: 2298–2303.
- [52] LIPSKY PE. Defining COX-2 inhibitors. *J Rheumatol Suppl* 2000; **60**: 13–16.
- [53] LU G, TSAI AL, VAN WART HE, KULMACZ RJ. Comparison of the peroxidase reaction kinetics of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1999; **274**: 16162–16167.
- [54] MACNAUGHTON WK, CUSHING K. Role of constitutive cyclooxygenase-2 in prostaglandin-dependent secretion in mouse colon *in vitro*. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; **293**: 539–544.
- [55] MAJNO G, JORIS I. Cells, tissues, and disease : principles of general pathology. Blackwell, Oxford, 1996.
- [56] MARNETT LJ, ROWLINSON SW, GOODWIN DC, KALGUTKAR AS, LANZO CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem* 1999; **274**: 22903–22906.



- [57] MASFERRER JL, ZWEIFEL BS, MANNING PT, HAUSER SD, LEAHY KM, SMITH WG, ISAKSON PC, SEIBERT K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 3228–3232.
- [58] MASFERRER JL, ZWEIFEL BS, SEIBERT K, NEEDLEMAN P. Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *J Clin Invest* 1990; **86**: 1375–1379.
- [59] MCADAM BF, CATELLA-LAWSON F, MARDINI IA, KAPOOR S, LAWSON JA, FITZGERALD GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 272–277.
- [60] MORHAM SG, LANGENBACH R, LOFTIN CD, TIANO HF, VOULOUMANOS N, JENNETTE JC, MAHLER JF, KLUCKMAN KD, LEDFORD A, LEE CA, ET AL. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 1995; **83**: 473–482.
- [61] MORTEAU O. Prostaglandins and inflammation: the cyclooxygenase controversy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000; **48**: 473–480.
- [62] MURAKAMI M, KAMBE T, SHIMBARA S, KUDO I. Functional coupling between various phospholipase A2s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J Biol Chem* 1999; **274**: 3103–3115.
- [63] NARUMIYA S, SUGIMOTO Y, USHIKUBI F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999; **79**: 1193–1226.
- [64] NIKI H, TOMINAGA Y, WATANABE-KOBAYASHI M, MUE S, OHUCHI K. Possible participation of cyclooxygenase-2 in the recurrence of allergic inflammation in rats. *Eur J Pharmacol* 1997; **320**: 193–200.
- [65] QIU ZH, GIJON MA, DE CARVALHO MS, SPENCER DM, LESLIE CC. The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A2 in regulating arachidonic acid release in macrophages. *J Biol Chem* 1998; **273**: 8203–8211.
- [66] REDDY BS, RAO CV, SEIBERT K. Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventive properties in colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1996; **56**: 4566–4569.
- [67] REDDY ST, HERSCHMAN HR. Transcellular prostaglandin production following mast cell activation is mediated by proximal secretory phospholipase A2 and distal prostaglandin synthase 1. *J Biol Chem* 1996; **271**: 186–191.
- [68] RICOTE M, LI AC, WILLSON TM, KELLY CJ, GLASS CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; **391**: 79–82.
- [69] SALMON JA, HIGGS GA. Prostaglandins and leukotrienes as inflammatory mediators. *Br Med Bull* 1987; **43**: 285–296.
- [70] SEIBERT K, ZHANG Y, LEAHY K, HAUSER S, MASFERRER J, PERKINS W, LEE L, ISAKSON P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 12013–12017.
- [71] SIMONIN MA, BORDJI K, BOYALT S, BIANCHI A, GOUZE E, BECUWE P, DAUCA M, NETTER P, TERLAIN B. PPAR-gamma ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **282**: C125–C133.
- [72] SLATER D, DENNES W, SAWDY R, ALLPORT V, BENNETT P. Expression of cyclo-oxygenase types-1 and -2 in human fetal membranes throughout pregnancy. *J Mol Endocrinol* 1999; **22**: 125–130.
- [73] SLATER DM, DENNES WJ, CAMPA JS, POSTON L, BENNETT PR. Expression of cyclo-oxygenase types-1 and -2 in human myometrium throughout pregnancy. *Mol Hum Reprod* 1999; **5**: 880–884.
- [74] SMITH WL, DEWITT DL. Biochemistry of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and synthase-2 and their differential susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Semin Nephrol* 1995; **15**: 179–194.
- [75] SMITH WL, DEWITT DL, GARAVITO RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; **69**: 145–182.
- [76] SMITH WL, GARAVITO RM, DEWITT DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996; **271**: 33157–33160.
- [77] STRAUS DS, PASCUAL G, LIM, WELCH JS, RICOTE M, HSIANG CH, SENGCHANHALANGSY LL, GHOSH G, GLASS CK. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 4844–4849.
- [78] TENG X, ZHANG H, SNEAD C, CATRAVAS JD. Molecular mechanisms of iNOS induction by IL-1beta and IFN-gamma in rat aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **282**: C144–C152.

- [79] TOMLINSON A, APPLETON I, MOORE AR, GILROY DW, WILLIS D, MITCHELL JA, WILLOUGHBY DA. Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. *Br J Pharmacol* 1994; **113**: 693–698.
- [80] TSUJI S, TSUJII M, KAWANO S, HORI M. Cyclooxygenase-2 upregulation as a perigenetic change in carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 2001; **20**: 117–129.
- [81] VAN RYN J, TRUMMLITZ G, PAIRET M. COX-2 selectivity and inflammatory processes. *Curr Med Chem* 2000; **7**: 1145–1161.
- [82] VANE JR, MITCHELL JA, APPLETON I, TOMLINSON A, BISHOP-BAILEY D, CROXTALL J, WILLOUGHBY DA. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 2046–2050.
- [83] WILLIAMS CS, DUBOIS RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 1996; **270**: G393–400.
- [84] WILLIAMS TJ. Prostaglandin E2, prostaglandin I2 and the vascular changes of inflammation. *Br J Pharmacol* 1979; **65**: 517–524.
- [85] WILLOUGHBY DA, MOORE AR, COLVILLE-NASH PR. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 2000; **355**: 646–648.
- [86] WILLOUGHBY DA, MOORE AR, COLVILLE-NASH PR, GILROY D. Resolution of inflammation. *Int J Immunopharmacol* 2000; **22**: 1131–1135.
- [87] XIE WL, CHIPMAN JG, ROBERTSON DL, ERIKSON RL, SIMMONS DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 2692–2696.
- [88] XU XM, TANG JL, CHEN X, WANG LH, WU KK. Involvement of two Sp1 elements in basal endothelial prostaglandin H synthase-1 promoter activity. *J Biol Chem* 1997; **272**: 6943–6950.
- [89] YASOJIMA K, SCHWAB C, MCGEER EG, MCGEER PL. Distribution of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNAs and proteins in human brain and peripheral organs. *Brain Res* 1999; **830**: 226–236.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 14.02.2002 r.*

*Przyjęto: 19.04.2002 r.*

*Adres autora: ul. R. Ingardena 6, 30-060 Kraków*

*E-mail: kolac@zuc.iz.uj.edu.pl.*

## CYKLOOKSYGENAZY II. NIESTEROIDOWE LEKI PRZECIWZAPALNE JAKO ICH INHIBITORY<sup>1</sup>

### CYCLOOXYGENASES II. NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS AS THEIR INHIBITORS

Elżbieta Kołaczkowska\*

Zakład Immunobiologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński

*Streszczenie:* Odkryta w 1897 roku aspiryna (kwas acetylosalicylowy) była najważniejszym i najpowszechniej stosowanym lekiem przeciwzapalnym, przeciwbólowym i przeciwgorączkowym w XX wieku. Aspiryna i jej analogi o wspólnej nazwie Niesteroidowe Leki Przeciwzapalne (NSAIDs) działają poprzez wspólny mechanizm oparty na zdolności do hamowania enzymów cyklooksygenaz. Cyklooksygenazy istnieją w co najmniej dwóch odmianach: konstytutywnej (COX-1) i indukowanej (COX-2). Aspiryna i pozostałe klasyczne NSAIDs powodują zahamowanie obu izoform COX. Ponieważ prostaglandyny produkowane w wyniku aktywności katalitycznej COX-1 ochraniają błonę śluzową przewodu pokarmowego, dlatego też zahamowanie jej aktywności prowadzi do owrzodzeń żołądka i dwunastnicy. W celu zapobiegania rozwojowi owrzodzeń można równolegle podawać leki osłaniające śluzówkę przewodu pokarmowego oraz zastępować klasyczne NSAIDs przez ich odpowiedniki uwalniające tlenek azotu bądź połączone z fosfolipidami amfipatycznymi. Najnowsze badania pozwoliły na stworzenie selektywnych inhibitorów COX-2, które powodują tylko zahamowanie COX-2 odpowiedzialnej za symptomy zapalenia i reakcje bólowe. Nowa generacja NSAIDs charakteryzuje się podniesionym bezpieczeństwem, choć nie jest wolna od efektów ubocznych. Efekty te są konsekwencją konstytutywnej ekspresji COX-2 w nerkach, gojących się wrzodach i układzie rozrodczym. Coraz więcej doniesień wskazuje na istnienie trzeciej izoformy COX (COX-3), w tym badania nad paracetamolem. Mechanizm działania tego leku był dotychczas nieznan. Zdolność paracetamolu do hamowania bólu i gorączki, ale nie zapalenia, przy niskiej selektywności dla COX-1 i COX-2, wydaje się potwierdzać tę hipotezę. Powyższe odkrycia zmieniły pozycję aspiryny w XXI wieku. Jest ona obecnie zalecana, w małych dawkach, jako lek przeciwzakrzepowy w związku z wyłączną obecnością COX-1 w płytkach krwi.

*Słowa kluczowe:* COX – NSAID – nieselektywne inhibitory COX – selektywne inhibitory COX-2 – COX-3 – aspiryna – paracetamol

<sup>1</sup>Praca finansowana z DS/ZIE/IZ/UJ/2002.

\*Elżbieta Kołaczkowska jest stypendystką Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej.

*Summary:* Since its discovery in 1897 aspirin (acetylsalicylic acid) was the most important and common anti-inflammatory, analgesic and anti-pyretic drug throughout the twentieth century. Aspirin and aspirin-like drugs, named commonly Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs), exert their action through inhibition of cyclooxygenase enzymes. Cyclooxygenase exists in at least two isoforms: constitutive COX-1 and inducible COX-2. Aspirin and other classical NSAIDs inhibit both isoforms. As prostaglandins that are produced due to COX-1 activity protect mucosa of gastrointestinal tract, inhibition of this isoform leads to ulceration of stomach and duodenum. In order to prevent ulcer development mucosal coating drugs can be co-administrated, or classical NSAIDs may be substituted by NSAIDs releasing nitric oxide or associated with zwitterionic phospholipids. Recent studies led to development of selective COX-2 inhibitors inhibiting only COX-2 that is involved in inflammation and pain. New generation of NSAIDs is safer but not free of side effects that are due to constitutive expression of COX-2 in kidneys, healing ulcers and reproductive tract. Increasing number of studies, including those on paracetamol, implies existence of the third COX isoform (COX-3). Till now the mechanism of paracetamol action was unknown. The fact that paracetamol reduces pain and fever but not inflammation, while possessing low selectivity for COX-1 and COX-2, seems to confirm this hypothesis. Above discoveries changed the position of aspirin in the twenty-first century. Nowadays, low-dose aspirin is recommended as an anti-thrombotic drug since platelets contain exclusively COX-1.

*Key words:* COX – NSAID–non-selective COX inhibitors – selective COX-2 inhibitors – COX-3–aspirin – paracetamol

„Najlepszym sposobem pozbycia się problemu jest jego rozwiązanie”.

Alan A. Saporta

## WPROWADZENIE

Niesteroidowe Leki Przeciwzapalne (ang. *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*; NSAIDs) to grupa leków działająca głównie, choć nie wyłącznie [87, 91], poprzez hamowanie aktywności cyklooksygenazy (COX), enzymu uczestniczącego w biosyntezie prostaglandyn [92]. Niesteroidowe Leki Przeciwzapalne, a wśród nich aspiryna, należą do najczęściej przyjmowanych środków, gdyż w samych Stanach Zjednoczonych 17 mln ludzi przyjmuje je codziennie [36], ale równocześnie powodują największe komplikacje spośród wszystkich stosowanych terapii – prawdopodobieństwo wystąpienia owrzodzenia przewodu pokarmowego wynosi 20–30%, a ryzyko hospitalizacji dotyczy 1–2% pacjentów rocznie [32]. Cyklooksygenazy istnieją w co najmniej dwóch odmianach: konstytutywnej (COX-1) i indukowanej (COX-2). Stwierdzono, iż cytotoksyczność NSAIDs jest konsekwencją zahamowania COX-1, gdyż produkowane konstytutywnie prostaglandyny spełniają funkcje ochronne w przewodzie pokarmowym. Przełom w badaniach nad udoskonalaniem NSAIDs związany jest z odkryciem drugiej izoformy COX (COX-2) i zsyntetyzowaniem jej selektywnych inhibitorów o znacznie podwyższonym poziomie bezpieczeństwa [19, 30, 71]. Pomimo iż inhibitory te nie są całkowicie wolne od efektów ubocznych, ich zastosowanie otworzyło nowy rozdział w leczeniu stanów patologicznych, w tym reakcji zapalnych.

Ostatnie badania wykazują istnienie trzeciej izoformy COX (COX-3). Część z nich wskazuje, iż paracetamol może być pierwszym poznany inhibitorem COX-3 [5, 6].

## HISTORIA ODKRYCIA NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWZAPALNYCH

Odnalezione kamienne tablice pochodzące z czasów cywilizacji sumeryjskiej ujawniły, iż Asyryjczycy używali wyciągu z liści wierzby do leczenia bólu mięśni. Również starożytni Egipcjanie i Grecy stosowali wyciąg z liści lub kory wierzby w leczeniu stanów zapalnych i jako środka przeciwbólowego [37]. Choć w ciągu następujących wieków ekstrakt z kory wierzby był powszechnie używany jako analgetyk i środek przeciwzapalny, dopiero w XIX wieku wyizolowano z niego aktywny związek, salicylinę. W 31 lat później, w roku 1859, z salicyliny wyizolowano kwas salicylowy, który został następnie zsyntetyzowany [38]. Był on powszechnie używany ze względu na skuteczność w obniżaniu stanów gorączkowych, znoszeniu bólu i leczeniu stanów zapalnych. Największą jego wadą był okropny smak. Jak głosi legenda, ta właśnie cecha popchnęła Feliksa Hoffmana, młodego chemika zatrudnionego w firmie Bayer do badań, które doprowadziły do zsyntetyzowania kwasu acetylosalicylowego w 1897 r. [93]. Otóż ojciec F. Hoffmana cierpiał z powodu zaawansowanego reumatyzmu i miał zachęcać syna do stworzenia mniej gorzkiego, neutralnego w smaku leku. Kwas acetylosalicylowy otrzymał handlową nazwę Aspiryna (niem. *Aspiryn*): „A” oznacza grupę acetylową, a „spir” pochodzi od nazwy gatunkowej tawuły (*Spirea ulmania*), z której wyizolowano go po raz pierwszy [38]. Heinrich Dreser, dyrektor naukowy w Bayer, przetestował aspirynę na sobie i na zwierzętach laboratoryjnych, a badania te potwierdziły, iż jest skutecznym analgetykiem, lekiem przeciwgorączkowym i przeciwzapalnym [16]. Obecnie szacuje się, że roczna światowa produkcja aspiryny wynosi 50 tysięcy ton, a średnia liczba tabletek przyjmowanych przez jednego pacjenta to 80 sztuk rocznie [91]. Wskaźniki te byłyby na pewno wyższe, gdyby nie fakt, iż począwszy od lat pięćdziesiątych zsyntetyzowano wiele pochodnych kwasu acetylosalicylowego, które obecne są na rynku (około 15 specyfików). Poszukiwania tych leków związane były z faktem, że przyjmowanie aspiryny wywoływało poważne efekty uboczne, w tym uszkodzenia nerek i przewodu pokarmowego (szczegóły poniżej). Kolejne Niesteroიდowe Leki Przeciwzapalne, takie jak: ibuprofen, indometacyna, naproksen, mają właściwości przeciwzapalne zbliżone do aspiryny, ale z nieco tylko złagodzonymi skutkami ubocznymi, co wynika z faktu, iż hamują aktywność obu izoform cyklooksygenazy (inhibitory nieselektywne) [38]. Leki te określamy mianem klasycznych Niesteroიდowych Leków Przeciwzapalnych. NSAIDs najnowszej generacji to selektywne inhibitory cyklooksygenazy-2 [19, 52, 93].

## **SKUTKI UBOCZNE PRZYJMOWANIA KLASYCZNYCH NIESTEROIDOWYCH LEKÓW PRZECIWPALNYCH ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM ZMIAN W PRZEWODZIE POKARMOWYM**

Klasyczne NSAIDs mogą powodować poważne efekty uboczne, takie jak: zahamowanie agregacji płytek krwi, zwiększenie ciśnienia krwi u chorych z nadciśnieniem oraz komplikacje związane z przyjmowaniem leków obniżających ciśnienie (np. moczopędnych i blokerów receptorów  $\beta$ -adrenergicznych) [58, 63]. Leki te wywołują również niepożądane efekty u osób chorych na marskość wątroby i z chorobami nerek. Nefrotoksyczność NSAIDs obejmuje zatrzymywanie wody i elektrolitów prowadzące do powstania opuchlizny, ostrą niewydolność nerek i inne stany chorobowe [101].

Przede wszystkim jednak NSAIDs powodują poważne uszkodzenia przewodu pokarmowego. Cytotoksyczność dla komórek nabłonka śluzówki wydaje się skorelowana z hamującym wpływem danego leku na aktywność COX-1 (tab. 1). Prostaglandyny będące produktami aktywności katalitycznej tej izoformy odgrywają ważną rolę w normalnych procesach fizjologicznych zachodzących w śluzówce przewodu pokarmowego [94–96]. Prostaglandyny stymulują wydzielanie śluzu, pomagają utrzymać przepływ krwi w śluzówce oraz regulują cykl komórkowy i naprawę śluzówki (ryc. 1) [96]. W przypadku zahamowania produkcji prostaglandyn na skutek inaktywacji COX-1, procesy te zostają zakłócone i przewód pokarmowy jest narażony na działanie kwasów żołądkowych. Prowadzi to do różnorodnych komplikacji, od niegroźnej niestrawności do powstania wrzodów zagrażających życiu [32]. Ponadto, niektóre klasyczne NSAIDs mogą powodować bezpośrednie uszkodzenia błony śluzowej przewodu pokarmowego na skutek przenikania przez błonę lipidową do wnętrza komórek śluzówki powodując ich zniszczenie [32]. Aspiryna, na przykład, przy niskim pH jest niejonizowana i przez to rozpuszczalna w tłuszczach, co umożliwia jej wniknięcie do komórek nabłonka śluzówki. W wewnątrzkomórkowym pH aspiryna traci jednak zdolność rozpuszczania się w tłuszczach i zostaje uwięziona wewnątrz komórki. Prowadzi to do zahamowania funkcji życiowych komórki, prawdopodobnie na skutek zatrzymania przebiegu fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach [32].

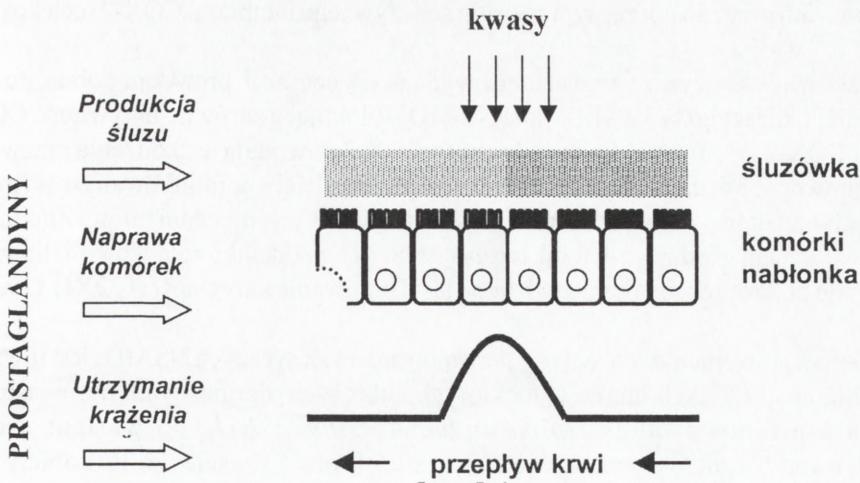
TABELA 1. Zależność pomiędzy niską selektywnością przykładowych Niesteroidowych Leków Przeciwpalnych a zwiększonym ryzykiem uszkodzenia błony śluzowej żołądka i dwunastnicy

### **SELEKTYWNOŚĆ INHIBITORÓW DLA COX-2 [65]**

Azapropazon < Piroksykam < Ibuprofen < Naproksen < Indometacyna < Diklofenak

### **STOPIEŃ CYTOTOKSYCZNOŚCI [32]**

Azapropazon > Piroksykam > Indometacyna > Naproksen > Diklofenak > Ibuprofen



RYCINA 1. Procesy kontrolowane przez prostaglandyny produkowane przez komórki błony śluzowej przewodu pokarmowego [93–95]

Istnieją również doniesienia poddające w wątpliwość, iż zdolność NSAIDs do zahamowania produkcji prostaglandyn zależnych od COX-1 jest odpowiedzialna za uszkodzenia dolnego odcinka przewodu pokarmowego, a przynajmniej, iż jest głównym mechanizmem wiodącym do tego efektu. Powyższe wątpliwości są szczegółowo dyskutowane w artykule przeglądowym autorstwa Lichtenbergera [48]. Są one oparte na pojedynczych obserwacjach zarówno doświadczalnych, jak i klinicznych, wskazujących na brak korelacji pomiędzy zmniejszeniem poziomu prostaglandyn w śluzówce a powstawaniem owrzodzeń i krwawień przewodu pokarmowego [11]. Komórki nabłonka śluzówki (np. żołądka) wydzielają fosfolipidy, głównie fosfatydylocholinę, które tworzą ochronną barierę hydrofobową. NSAIDs reagują z nimi chemicznie destabilizując tę warstwę fosfolipidów [28]. Oddziaływania takie mogą prowadzić do ekspozycji błony śluzowej i komórek nabłonka śluzówki na szkodliwe działanie kwasów (m.in. HCl) i soli kwasów żółciowych [50]. Pokazano również, iż NSAIDs są wydzielane do żółci, a więc włączane są w system krążenia jelitowo-wątrobowego [48]. Fosfolipidy zawarte w żółci, podobnie jak w błonie śluzowej, są odpowiedzialne za redukcję cytotoksyczności soli kwasów żółciowych. W normalnych warunkach fosfolipidy zawarte w żółci tworzą micelle z solami kwasów żółciowych (micelle mieszane) prowadząc do neutralizacji kwasów. NSAIDs wiążąc fosfolipidy powodują przekształcenia mieszanych micelli w micelle cytotoksycznych soli kwasów żółciowych [2].

Powyższą hipotezę wydają się wspierać dane pochodzące z badań nad zwierzętami pozbawionymi COX-1 (*cox-1/cox-2\**), u których istotnie nie stwierdzono tworzenia się spontanicznego owrzodzenia pomimo braku konstytutywnej produkcji prostaglandyn w przewodzie pokarmowym [43]. Ponadto opublikowano doniesienie, iż niedawno

zsyntetyzowany selektywny inhibitor COX-1 (SC-560) wywołał uszkodzenia śluzówki żołądka tylko przy równoczesnym podaniu selektywnego inhibitora COX-2 (celekoksib) [97].

Aczkolwiek powyższe rozważania wydają się spójne i prawdopodobne, to nie wyjaśniają, dlaczego tylko klasyczne NSAIDs, blokujące zarówno aktywność COX-1, jak i COX-2, ale nieselektywne inhibitory COX-2 powodują uszkodzenia przewodu pokarmowego. Wydaje się, że problem ten jest bardziej skomplikowany i wymaga dalszych badań nad wyjaśnieniem wszystkich możliwych mechanizmów. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, za cytotoksyczność NSAIDs w odcinku żołądkowo-jelitowym przewodu pokarmowego odpowiedzialne jest hamowanie aktywności COX-1 [19, 32, 94, 95].

Istotnym problemem związanym z przyjmowaniem klasycznych NSAIDs jest również brak tolerancji dla tych leków w niektórych chorobach alergicznych, np. w astmie. Astma aspirynowa (ang. *aspirin-induced asthma*; AIA) to wariant astmy obserwowany u ok. 10% dorosłych osób (2,5-krotnie częściej są to kobiety niż mężczyźni) cierpiących na tę chorobę [80–82]. U większości pacjentów pierwsze symptomy (intensywny nieżyt nosa) pojawiają się po przekroczeniu 30 roku życia, a w ciągu kilku lat rozwija się astma oskrzelowa, której towarzyszy brak tolerancji dla aspiryny [81]. U pacjentów cierpiących na AIA podanie aspiryny lub innego klasycznego NSAID wywołuje zagrażające życiu ostre ataki astmy, którym towarzyszy wyciek z nosa, przekrwienie spojówek, zaczerwienienie twarzy i szyi [82]. Pomimo zaniechania przyjmowania NSAIDs astma aspirynowa nie cofa się (np. we krwi utrzymuje się podwyższona liczba eozynofili) i może pozostać na całe życie. Obecnie za najbardziej prawdopodobne wytłumaczenie farmakologicznych i klinicznych objawów AIA uważa się „teorię cyklooksygenazy” [80]. Zgodnie z tą teorią ataki AIA są konsekwencją zahamowania COX przez aspirynę i inne NSAIDs w drogach oddechowych. Towarzyszy temu zwiększona produkcja leukotrienów cysteinowych, w tym  $LTC_4$ ; jest to najprawdopodobniej mechanizm kompensujący zahamowanie produkcji prostaglandyn (porównaj w [40]). Z kolei  $LTC_4$  jest najważniejszym mediatorem zwężającym oskrzela, co tłumaczy ostre ataki astmy [80]. Ostatnio pokazano, iż astma aspirynowa jest wywoływana przez NSAIDs, które hamują obie cyklooksygenazy lub COX-1, ale nie COX-2 [81]. Stąd selektywne inhibitory COX-2 mogą być bezpiecznie przyjmowane przez pacjentów z AIA.

### Równoczesne podanie leków używanych w leczeniu owrzodzeń przewodu pokarmowego

Efekty uboczne wywoływane przez klasyczne NSAIDs, przy ich powszechnym i często chronicznym przyjmowaniu, zainicjowały badania nad zastosowaniem leków osłaniających błonę śluzową przewodu pokarmowego, leków hamujących wydzielanie soków żołądkowych i analogów prostaglandyn, jako leków profilaktycznych w przyjmowaniu NSAIDs.



*Leki osłaniające błonę śluzową żołądka* – Sukralfat (*Sucralfate*) jest jedynym lekiem z tej grupy, który był testowany pod kątem zapobiegania cytotoksyczności NSAIDs [32]. Leki te mają cechy, z którymi wiązano duże nadzieje: pokrywają owrzodzoną błonę śluzową, wchłaniają powierzchniowo pepsynę i kwasy żółciowe, stymulują produkcję prostaglandyn endogennych [13]. Jednak testy kliniczne wykazały ich małą skuteczność w zapobieganiu tworzeniu owrzodzeń wywoływanych przez klasyczne NSAIDs, a jedyną obserwowaną poprawą było zmniejszenie problemów związanych z niestrawnością [32]. Ponadto leki osłaniające błonę śluzową żołądka mogą zmniejszać wchłanianie stosowanych leków [8].

*Antagoniści receptorów histaminowych typu  $H_2$*  – Leki z tej grupy mają zdolność do blokowania akcji histaminy, która w wyniku interakcji ze swoimi receptorami typu drugiego ( $H_2$ ) indukuje wydzielanie kwasów żołądkowych [34]. Stosowanie antagonistów receptorów  $H_2$  (m.in. ranitydyny) w dawkach standardowych okazało się skuteczne w zapobieganiu powstawaniu owrzodzenia dwunastnicy, ale nie żołądka, podczas gdy to właśnie ten drugi typ stanowi największy problem u pacjentów przyjmujących NSAIDs [32]. Przeprowadzono również testy kliniczne, w których wraz z NSAIDs podawano pacjentom wysokie dawki famotydyny (*Famotidine*). Okazało się, iż w wysokich dawkach lek ten chronił przed owrzodzeniami obu narządów [83]. Co ciekawe, podobnego zjawiska nie zaobserwowano w przypadku dużych dawek ranitydyny (*Ranitidine*) [86]. Wyniki te mogą sugerować, iż owrzodzenie błony śluzowej żołądka, ale nie dwunastnicy, jest niezależne od działalności kwasów, choć mechanizm tego zjawiska w przypadku wysokiej dawki famotydyny nie jest jeszcze poznany [94].

*Inhibitory pompy protonowej* – Leki z tej grupy hamują działanie pompy wodorowej (protonowej) generującej gradient stężenia protonów po obu stronach błony komórkowej. Gradient ten służy do transportu jonów i drobnocząsteczkowych związków organicznych, wykorzystywanych przez komórki błony śluzowej żołądka do produkcji kwasu solnego [55]. Prowadzi to do zmniejszenia uszkodzeń błony śluzowej przez NSAIDs dzięki wzrostowi pH soku żołądkowego do 4 i powyżej, jak obserwowano w testach nad omeprazolem (*Omeprazole*) [31]. Lek ten okazał się skuteczny w zapobieganiu powstawaniu owrzodzeń żołądka i dwunastnicy (z wyjątkiem powierzchniowych nadżerek) oraz w zapobieganiu nawrotom choroby wrzodowej u chorych przyjmujących NSAIDs przewlekłe [12]. Wyniki te spowodowały, iż omeprazol jest stosowany w praktyce. Niemniej należy zaznaczyć, iż jego skuteczność w poważnych przypadkach owrzodzeń jest ciągle nieznana [32].

*Analogi prostaglandyn* – Najlepiej zbadanym lekiem z tej grupy jest mizoprostol (*Misoprostol*) będący syntetycznym analogiem prostaglandyny  $E_1$  [32]. Suplementacja  $PGE_1$ , przez podanie mizoprostolu, umożliwia utrzymanie integralności błony śluzowej i jej prawidłowego ukrwienia [64]. Lek ten ma również pewne zdolności do redukcji poziomu wydzielanych kwasów żołądkowych. Podobnie jak omeprazol, mizoprostol okazał się skuteczny w profilaktyce owrzodzeń zarówno żołądka, jak i dwunastnicy [31]. Ponadto lek ten zmniejsza powstawanie poważnych komplikacji wynikających z owrzodzenia błon śluzowych po terapii NSAIDs [64]. Niestety jednak leczenie

mizoprosolem jest często źle znoszone z powodu niepożądanych skutków ubocznych, takich jak: biegunki i bóle brzucha [32].

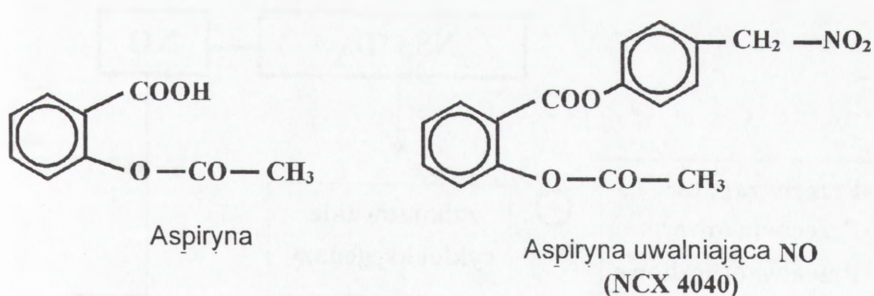
Równoczesne podanie, wraz z NSAIDs, leków używanych w leczeniu owrzodzeń przewodu pokarmowego okazuje się być skuteczną metodą, głównie w przypadku omeprazolu i mizoprostolu. Ranitydyna jest zalecana dla pacjentów z chorobą wrzodową dwunastnicy. Przeprowadzono testy kliniczne, w których bezpośrednio porównywano skuteczność powyższych leków [31, 32, 105]. Okazało się, iż omeprazol był statystycznie znacząco bardziej efektywny niż ranitydyna w leczeniu już istniejących wrzodów [105], podczas gdy skuteczność mizoprostolu była zbliżona [31]. Omeprazol był najskuteczniejszy w zapobieganiu nawrotów choroby wrzodowej i w przeciwdziałaniu niestrawności. Ponadto omeprazol był lepiej tolerowany niż mizoprostol [32]. Z kolei w leczeniu powierzchniowych nadżerek błony śluzowej żołądka lepsze wyniki obserwowano po zastosowaniu mizoprostolu [31]. Podsumowując, choć powyższe leki stosowane wraz z klasycznymi NSAIDs powodowały poprawę niektórych parametrów związanych z uszkodzeniami błony śluzowej, to jednak żaden nie był wolny od efektów ubocznych. Dodatkowym mankamentem takiej terapii jest obciążenie pacjenta drugim lekiem, również nie zawsze dobrze tolerowanym.

#### Niesteroidowe Leki Przeciwpalne uwalniające tlenek azotu (NO-NSAIDs)

Kolejne badania mające na celu rozwiązanie problemu cytotoksyczności klasycznych NSAIDs zostały skierowane na udoskonalenie leków już istniejących. Efektem tych badań było zsyntetyzowanie NSAIDs zmodyfikowanych przez dodanie im fragmentu uwalniającego tlenek azotu (NO; ang. *nitric oxide*). Stworzono w ten sposób, na przykład, zmodyfikowaną aspirynę (ryc. 2) [59, 95, 98]. Zsyntetyzowane NO-NSAIDs mają dodatkowy fragment nitroksybutylowy (z grupą NO<sub>2</sub>) lub nitrozotiolowy (z grupą NO) połączony z NSAID wiązaniem estrowym [20]. Wybór tlenu azotu nie był przypadkowy, gdyż wiadomo obecnie, iż mediator ten odgrywa ważną rolę w ochronie przewodu pokarmowego, a wiele z jego działań jest wspólnych z prostaglandynami [96, 97, 99]. W szczególności teoretyczną podstawą do stworzenia NO-NSAIDs były następujące obserwacje [20, 59, 94–97, 99]:

- zarówno prostaglandyny (PG), jak i tlenek azotu (NO) są niezbędne do efektywnej obrony śluzówki przewodu pokarmowego;
- związki te współregulują przepływ krwi przez śluzówkę, wydzielanie śluzu i naprawę uszkodzeń błony śluzowej;
- zahamowanie produkcji bądź PG bądź NO może być kompensowane poprzez wzrost aktywności drugiego z tych mediatorów; czynniki te mogą również krzyżowo regulować aktywność syntaz odpowiedzialnych za ich produkcję (COX, NOS) [60, 70].

Mając na uwadze powyższe zależności, stworzono Niesteroidowe Leki Przeciwpalne uwalniające tlenek azotu, które, jak się spodziewano, będą wykazywały toksyczność mniejszą niż wyjściowe NSAIDs, pomimo nieselektywnego hamowania aktywności COX [94]. Zsyntetyzowane nitroksybutylo-NO-NSAIDs przetestowano



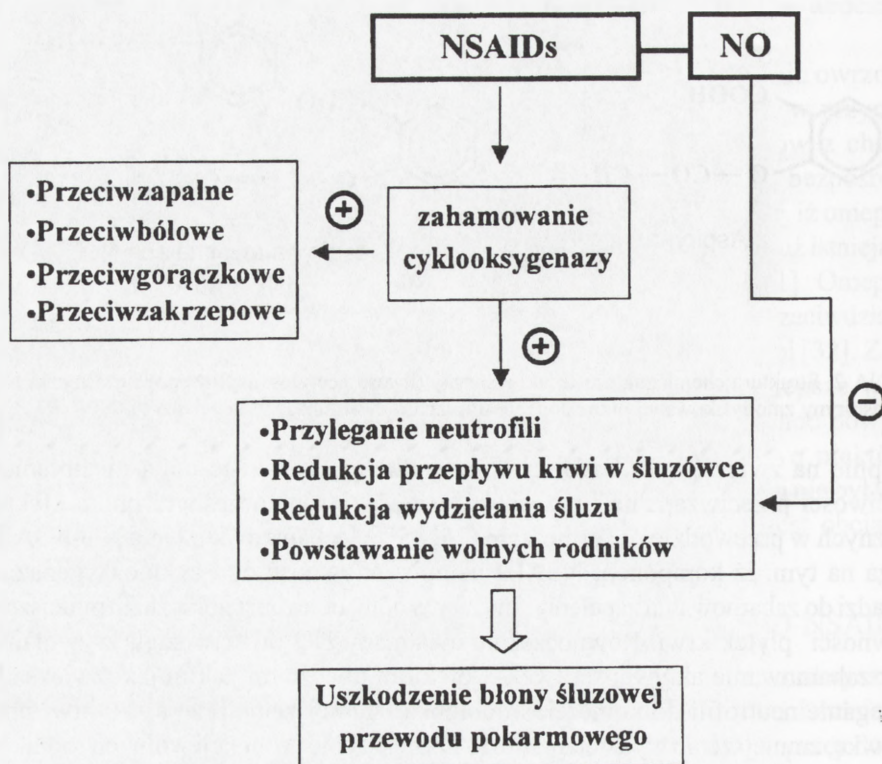
RYCINA 2. Struktura chemiczna cząsteczki aspiryny (kwasu acetylosalicylowego) i cząsteczki NCX 4040, aspiryny zmodyfikowanej przez dodanie fragmentu uwalniającego tlenek azotu (NO) [97]

następnie na zwierzętach. Badania te potwierdziły, iż leki te mają niezmienną właściwość przeciwzapalną i przeciwbólową, przy równoczesnym braku efektów ubocznych w przewodzie pokarmowym [15, 85]. Mechanizm działania NO-NSAIDs polega na tym, iż komponent NSAID hamuje aktywność obu cyklooksygenaz, co prowadzi do zahamowania zapalenia, zniesienia bólu, obniżenia gorączki i zmniejszenia aktywności płytek krwi. Równocześnie uwalniany NO przeciwdziała wywołanym przez zahamowanie aktywności COX-1 efektom ubocznym, takim jak: zwiększone przyleganie neutrofilów do komórek śródbłonna, zmniejszenie przepływu krwi przez śluzówkę, zmniejszenie wydzielania śluzu i zwiększenie produkcji wolnych rodników. Dzięki temu nie dochodzi do uszkodzenia błony śluzowej przewodu pokarmowego (ryc. 3) [15, 59, 94]. Wbrew obawom nie zaobserwowano systemowych efektów ubocznych uwalniania NO (np. zmian ciśnienia tętniczego), najprawdopodobniej dzięki temu, iż NO jest uwalniany powoli i/lub w małych ilościach [94]. Ponadto, NO-NSAIDs przyspieszają gojenie się istniejących już wrzodów [18] oraz przywracają normalne funkcjonowanie nerek [22].

Pozytywne wyniki badań na zwierzętach eksperymentalnych pozwoliły na rozpoczęcie badań klinicznych, które są obecnie w toku [32, 95].

### Niesteroidowe Leki Przeciwzapalne połączone z amfipatycznymi fosfolipidami

Biofizyczne właściwości błony śluzowej żołądka przejawiają się powstaniem bariery hydrofobowej, która nie tylko pokrywa znajdujący się poniżej nabłonek, ale również tworzy warstwę chroniącą przed działaniem kwasów żołądkowych (porównaj w *Skutki uboczne przyjmowania klasycznych Niesteroidowych Leków Przeciwzapalnych*) [48]. Lichtenberger i Goddard pokazali, iż NSAIDs łącząc się z fosfolipidami zlokalizowanymi na powierzchni śluzówki powodują zniesienie właściwości hydrofobowych tej warstwy przyczyniając się do uszkodzeń znajdujących się poniżej komórek [94]. Zgodnie z ich hipotezą połączenie klasycznych NSAIDs z amfipatycznymi fosfolipidami powinno zredukować wywoływane przez nie owrzodzenia



RYCINA 3. Mechanizm działania Niesteroidowych Leków Przeciwzapalnych uwalniających tlenek azotu (NO-NSAIDs) [93 zmodyfikowane]

odcinka żołądkowo-jelitowego przewodu pokarmowego. Na podstawie powyższej hipotezy L. Lichtenberg i zespół stworzyli aspirynę połączoną z dwupalmitylofosfatydylocholiną (DPPC) [51, 94]. Testy na modelach zwierzęcych potwierdziły, iż DPPC-aspiryna nie spowodowała obniżenia hydrofobowości błony śluzowej, krwawienia ani innych uszkodzeń błony śluzowej żołądka. Ponadto przy stosowaniu DPPC-aspiryny nie tylko nie stwierdzono obniżenia przeciwzapalnego, przeciwbólowego i przeciwgorączkowego oddziaływania, ale wręcz jego zwiększenie w stosunku do aspiryny [51]. Przeprowadzono również badania na zdrowych ochotnikach, którym podawano przez 4 dni aspirynę lub aspirynę połączoną z fosfatydylocholiną [1]. Uzyskane wyniki wskazują, iż zmodyfikowana aspiryna prowadziła do zmniejszenia uszkodzeń błony śluzowej żołądka, ale nie dwunastnicy i nie naruszyła warstwy hydrofobowej [94]. DPPC-aspiryna musi być jeszcze przetestowana u pacjentów przyjmujących lek w sposób chroniczny. Ostatnio opublikowano wyniki badań nad DPPC-ibuprofenem, innym klasycznym NSAID, na ostrym i chronicznym modelu zapalenia stawów wywołanym przez podanie szczurom kompletnego adjuwanta Freund'a [49]. Uzyskane rezultaty wskazują na podobną zależność jak w przypadku DPPC-aspiryny: wzrost przeciwzapalnych i przeciw-

bólowych właściwości ibuprofenu. Choć efekt ten jest istotny, to dla pełnej oceny przydatności DPPC-ibuprofenu niezbędne jest jeszcze przeprowadzenie badań nad jego cytotoksycznością w stosunku do błony śluzowej przewodu pokarmowego.

## SELEKTYWNE INHIBITORY CYKLOOKSYGENAZY-2

Badaniom nad skutecznością i bezpieczeństwem klasycznych NSAIDs towarzyszyły badania nad stworzeniem selektywnych inhibitorów COX-2. Jeżeli bowiem przeciwzapalne i przeciwbólowe właściwości NSAIDs wynikają z ich zdolności do zahamowania COX-2, a efekty uboczne są konsekwencją zahamowania COX-1 [91], to zablokowanie aktywności tylko drugiej izoformy COX powinno rozwiązać problem cytotoksyczności NSAIDs. Ale jak w tym kontekście wytłumaczyć przeciwzapalne właściwości aspiryny hamującej COX-1? Obecnie istnieje coraz więcej wskazówek na to, że aspiryna działa również poprzez inne mechanizmy niż blokowanie COX-1: powoduje zahamowanie NFκB, działa pro-apoptotycznie, modyfikuje transkrypcję COX-2 [39].

### Selektywność inhibitorów dla COX-1 i COX-2

L. Lipsky zaproponował klasyfikację selektywnych inhibitorów uwzględniającą trzy kategorie [52]. Pierwsza kategoria to określenie biochemicznej selektywności leku w warunkach *in vitro*. Inhibitor można testować w systemach wykorzystujących enzymy zwierzęce, ludzkie bądź rekombinowane (*recombinant-enzyme assay*) [66, 91], w których oznacza się ilościowo produkty reakcji (prostaglandyny): enzym (COX-1 lub COX-2), substrat (np. kwas arachidonowy) oraz testowany inhibitor. W badaniach tych wyznacza się  $IC_{50}$  – stężenie leku, przy którym dochodzi do 50% zahamowania aktywności enzymatycznej [19]. Selektywność inhibitora definiuje się jako stosunek  $IC_{50}$  dla COX-2 do  $IC_{50}$  dla COX-1, tzn. im większa jest selektywność dla COX-2, tym mniejszy jest stosunek COX-2/COX-1 [30]. Ograniczeniem takich obliczeń jest wymóg, że selektywność może być wyznaczona tylko wówczas, gdy sigmoidalne krzywe stężenia dla obu izoform służące do wyznaczenia  $IC_{50}$  są równoległe [19, 66].

Następna kategoria to oszacowanie biologicznej i farmakologicznej selektywności inhibitora w badaniach *in vivo*, w których wykorzystuje się tkankowo specyficzną ekspresję izoform COX [30, 52]. Zwierzętom laboratoryjnym podaje się testowany inhibitor, a następnie oznacza się zahamowanie aktywności każdej z izoform, poprzez pomiar produkcji PG. W przypadku COX-1 oznaczenia dokonuje się w przewodzie pokarmowym, a COX-2 w ognisku zapalnym (u zwierząt wywołuje się uprzednio lokalny odczyn zapalny np. jamy otrzewnej). Alternatywnie, inhibitor testuje się *ex vivo* w teście wykorzystującym ludzką krew (*whole blood test*) [100]. W badaniach tych jako indeks aktywności COX-1 służy produkcja tromboksanów przez płytki krwi w czasie procesu krzepnięcia, gdyż w pozbawionych jądra płytkach krwi nie zachodzi indukowana ekspresja COX-2. Z kolei w wyniku stymulacji LPS dochodzi do ekspresji COX-2 w monocytach, co można pośrednio oznaczyć mierząc poziom  $PGE_2$  [30].

Pozytywne przejście powyższych testów umożliwia rozpoczęcie badań klinicznych umożliwiających ostateczne oszacowanie selektywności danego inhibitora u ludzi [21].

Określenie danego inhibitora jako selektywny dla danej izoformy nie oznacza, iż hamuje on wyłącznie tę odmianę, np. uznawana za selektywny inhibitor COX-1 aspiryna jest 100-krotnie bardziej selektywna dla COX-1 niż dla COX-2, natomiast celekoksib, jeden z najpotężniejszych inhibitorów COX-2, jest 375-krotnie bardziej selektywny dla COX-2 (wg testu z rekombinowanymi enzymami) [52]. Zaproponowano, aby inhibitor, który w dawkach terapeutycznych hamuje COX-2 nie wywołując obserwowalnego wpływu na COX-1, nazywać specyficznym inhibitorem COX-2 [7]. Farmakolodzy jednak definiują „specyficzny inhibitor” bardziej rygorystycznie niż „selektywny” [91]. Ten pierwszy musi mieć około 1000-krotnie większą selektywność dla jednej z izoform, podczas gdy lek o 100-krotnie większej selektywności to dobry selektywny inhibitor. Obecnie za selektywny inhibitor COX-2 uznaje się taki, który hamuje produkcję PG w ognisku zapalnym, ale nie blokuje syntezy PG w przewodzie pokarmowym [94].

Stworzenie selektywnych inhibitorów COX-2 zmieniło klasyfikację NSAIDs. Obecnie możemy je podzielić na 4 kategorie ze względu na zdolność do hamowania aktywności COX-1 lub COX-2 (tab. 2) [100]. Klasyfikacja ta obejmuje selektywne inhibitory COX-1, NSAIDs ze słabą selektywnością, selektywne inhibitory COX-2 i inhibitory preferujące COX-2. Ta ostatnia grupa charakteryzuje się tym, iż w małych stężeniach leki te hamują tylko COX-2, ale w większych stężeniach mogą również hamować COX-1 [52]. Bez względu na posiadaną selektywność NSAIDs mogą działać powodując zahamowanie COX poprzez różne mechanizmy [78]. Generalnie wiązanie enzymu z inhibitorem może być odwracalne, nieodwracalne (wiązanie kowalencyjne), lub praktycznie (pozornie) nieodwracalne przy powolnej dysocjacji (tab. 2).

### Mechanizm pozwalający na selektywne zahamowanie aktywności COX-2

Zasadnicze różnice w budowie cząsteczek i centrów katalitycznych COX-1 i COX-2 zostały omówione w części I niniejszego artykułu. W tym miejscu przedstawione będą te różnice, które wykorzystano przy syntezy selektywnych inhibitorów COX-2 (ryc. 4).

Cyklooksygenaza-2 ma szersze wejście do kanału hydrofobowego, a jego sklepienie jest bardziej elastyczne niż w COX-1 [54]. W normalnych warunkach, bez obecności inhibitorów, kwas arachidonowy wchodzi do wnętrza enzymu, gdzie w miejscu aktywności katalitycznej dochodzi do powstania prostanoidów, np. prostaglandyn. Zarówno cyklooksygenaza-1, jak i -2 w pozycji 120 sekwencji aminokwasowej mają argininę [30], z którą wiążą się klasyczne NSAIDs [88]. Najistotniejsza różnica pomiędzy izoformami to obecność innych aminokwasów w pozycji 523: w cząsteczce COX-1 znajduje się tam izoleucyna, a w cząsteczce COX-2 – walina [45]. Walina jest mniejsza od izoleucyny, ma jedną grupę metylową mniej, co prowadzi do utworzenia kieszeni bocznej w ścianie kanału (ryc. 4), która jest miejscem wiązania się selektywnych inhibitorów COX-2, co uniemożliwia kontakt kwasu arachidonowego z centrami katalitycznymi [30]. Izoleucyna w pozycji 523 w COX-1 jest wystarczająco duża (pomimo tak małej różnicy w stosunku do waliny), aby zablokować dostęp do kieszeni

TABELA 2. Klasyfikacja Niesteroidowych Leków Przeciwwzapalnych (NSAIDs) [wg 51]

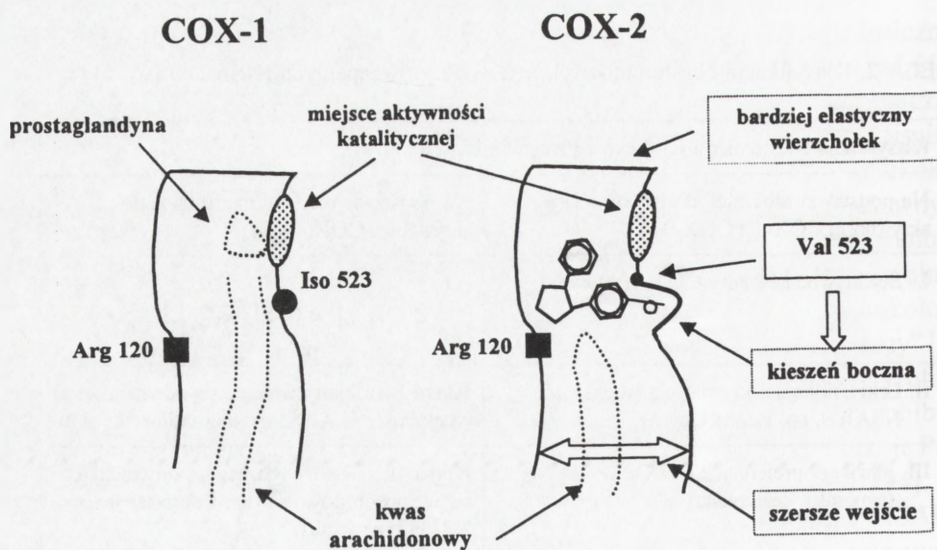
Klasyfikacja Niesteroidowych Leków Przeciwwzapalnych	
Na podstawie zdolności do hamowania aktywności COX-1 i COX-2	Na podstawie mechanizmu hamowania aktywności COX:
I. Selektywne inhibitory COX-1 (aspiryna)	$E + I \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} EI \xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2} EI^*$
II. Leki z niską selektywnością (większość NSAIDs, np. indometacyna)	<b>Klasa I:</b> inhibitory wiążące się odwracalnie (większość NSAIDs, np. ibuprofen) $k_2 = 0$
III. Inhibitory preferujące COX-2 (nimesulid, celekoksib)	<b>Klasa II:</b> inhibitory wiążące się odwracalnie, ale w sposób powolny (np. indometacyna, NS-398, nimesulid) $k_2 > 0$ $k_{-2} > 0$
IV. Selektywne inhibitory COX-2 (NS-398, rofekoksib)	<b>Klasa III:</b> inhibitory tworzące nieodwracalne wiązanie (np. aspiryna) $k_2 > 0$ $k_{-2} = 0$

bocznej (ryc. 4). Mutacja punktowa polegająca na podstawieniu izoleucyny walina okazała się wystarczająca, aby COX-1 mogła być blokowana przez selektywne inhibitory COX-2 [24].

### „Super aspiryny” – nowa generacja NSAIDs

Zsyntetyzowane selektywne inhibitory COX-2 (tab. 2) były testowane na zwierzęcych modelach ostrego i chronicznego odczynu zapalnego [23, 27, 62, 67]. W badaniach tych określano zdolność tych leków do zniesienia bólu, gorączki i innych objawów zapalenia przy jednoczesnym zachowaniu integralności błony śluzowej przewodu pokarmowego. Okazało się, iż istotnie selektywne inhibitory COX-2 nie powodowały owrzodzeń śluzówki żołądka i dwunastnicy oraz nie blokowały COX-1-zależnej funkcji płytek krwi [58]. Ponadto, leki te wykazywały silne właściwości przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwgorączkowe [91]. Niezmienione w stosunku do klasycznych NSAIDs właściwości terapeutyczne są warunkiem niezbędnym dopuszczenia leku do dalszych testów klinicznych [21]. „Super aspiryny” okazały się również skuteczne w hamowaniu wzrostu nowotworów, głównie jelita grubego, angiogenezy i polipowatości jelit, gdyż nie blokowały syntezy prostaglandyn konstitutywnych [21]. Zastosowanie selektywnych inhibitorów COX-2 wydaje się również obiecujące w terapii osób z chorobą Alzheimera w związku z doniesieniami o zwiększonej ekspresji tej izoforny w przebiegu choroby [35].

Śród selektywnych inhibitorów COX-2 (tab. 2) amerykańska *Food and Drug Administration* dopuściła dwa leki do użytku terapeutycznego [88]. Celekoksib (nazwa handlowa: Celebrex™) i Rofekoksib (Vioxx™) są obecne także na rynku polskim.



RYCINA 4. Różnice w strukturze COX-1 i COX-2, zaznaczono różnicę (kieszka boczna) wykorzystaną w syntezie selektywnych inhibitorów COX-2 [wg 19, 30, 87]

### Celekoksib

Celekoksib (zmodyfikowany SC-58125) (ryc. 5) jest inhibitorem COX-2 o wysokiej selektywności. Jest on 375 razy bardziej selektywny dla COX-2 niż dla COX-1 [53]. Celekoksib jest amidem kwasu sulfonowego, który ulega przemianom metabolicznym i jest wydalany głównie przez wątrobę z żółcią [88]. Lek ten został zatwierdzony, w konsekwencji pozytywnych testów klinicznych, jako środek przeciwbólowy w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów oraz zapalenia kości i stawów [29]. Na przykład, pokazano, iż u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów przyjmujących celekoksib przez 4 tygodnie lek ten znacząco poprawił ogólną kondycję oraz zmniejszył sztywność i bolesność stawów [53]. Również krótkotrwałe testy potwierdziły jego dobre właściwości analgetyczne w bólach zębów i w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów oraz zapalenia kości i stawów [42].

### Rofekoksib

Rofekoksib (MK-0966) (ryc. 5) charakteryzuje się 80- do 1000-krotnie (w zależności od testu) większą selektywnością dla COX-2 w stosunku do COX-1 [100]. Lek ten jest furanem, który ulega przemianom na skutek działalności enzymów wątroby i jest wydalany głównie z moczem [88]. Rofekoksib może być przyjmowany przez pacjentów uczulonych na amidy kwasu sulfonowego. MK-0966 został zatwierdzony jako analgetyk w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów lub zapalenia kości i

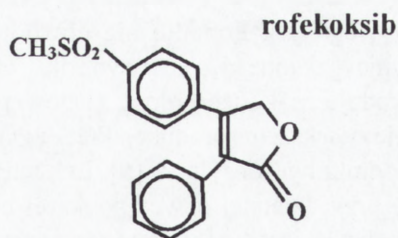
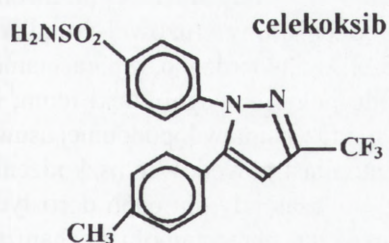


stawów oraz w przeciwdziałaniu ostremu bólowi menstruacyjnemu [29, 88]. W przykładowych badaniach wykazano, iż sześciotygodniowe przyjmowanie rofekoksibu spowodowało zmniejszenie sztywności stawów i poprawę ogólnej kondycji pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem kości i stawów kolanowych i biodrowych [17]. Jego skuteczność była na poziomie efektywności diklofenaku [9]. Ponadto rofekoksib wykazywał właściwości przeciwozapalne [72]. Skuteczność rofekoksibu w przeciwdziałaniu bólowi po operacjach dentystycznych była porównywalna z ibuprofenem i naproksenem [57].

### Efekty uboczne przyjmowania selektywnych inhibitorów COX-2

Podstawowym założeniem, które dało początek stworzeniu nowej generacji NSAIDs, było przyjęcie, iż uszkodzenia/owrzodzenia błony śluzowej żołądka i dwunastnicy są konsekwencją zahamowania aktywności COX-1 [71]. W praktyce okazało się, iż rzeczywiście selektywne inhibitory COX-2, celekoksib i rofekoksib, powodują owrzodzenia przewodu pokarmowego tylko na poziomie placebo [44, 76]. Ponadto pokazano, iż rofekoksib zredukował o 49% prawdopodobieństwo powstania komplikacji gastrycznych w okresie powyżej jednego roku od rozpoczęcia przyjmowania leku, w stosunku do standardowych NSAIDs [44].

Selektywne inhibitory COX-2 nie wpływają również na funkcję płytek krwi, jak pokazano w testach *in vitro* (testy na zdolność do agregacji) i w warunkach *in vivo* (czas krwawienia) [89]. Brak wpływu zahamowania COX-2 na funkcjonowanie płytek krwi wypływa z tego, że mają one tylko COX-1 [71]. W związku z tym jednak selektywne inhibitory COX-2 nie mogą zapewnić ochrony kardiologicznej opartej na tym mechanizmie. Uważa się, iż osoby, które mają lub są narażone na schorzenia układu krwionośnego, powinny przyjmować aspirynę w małych dawkach, w których nie wywołuje ona szkodliwego wpływu na układ pokarmowy [33]. Istnieją jednak wyniki wskazujące na to, iż nawet w takich dawkach aspiryna może częściowo lub całkowicie niwelować korzyści z przyjmowania selektywnych inhibitorów COX-2 [4, 73].



RYCINA 5. Struktura chemiczna selektywnych inhibitorów COX-2 dopuszczonych do stosowania u ludzi [19]

Wiadomo, iż w czasie procesu gojenia się wrzodów ekspresja COX-2 jest zwiększona [84]. Zgodnie z oczekiwaniami, zahamowanie COX-2 powodowało spowolnienie tego procesu [56]. Blokada COX-2 powodowała również zaostrzenie odpowiedzi zapalnej w trakcie zwierzęcego modelu zapalenia okrężnicy [65]. Efekty te nie były jednak większe niż w przypadku klasycznych NSAIDs [56, 65].

W nerkach zdrowej dorosłej osoby ma miejsce ekspresja zarówno COX-1, jak i COX-2, dlatego też spodziewano się efektów ubocznych przyjmowania selektywnych inhibitorów COX-2 na funkcjonowanie tego właśnie narządu [41]. Badania kliniczne potwierdziły te obawy. Przyjmowanie celekoksibu i rofekoksibu (przez 1 do 2 tygodni) powodowało przejściowe okresy (1–3 dni) zatrzymania sodu w nerkach [10, 69]. Znaczenie tego procesu nie jest jasne. Ponieważ zaobserwowano również przypadki obrzęku po przyjęciu obu leków, uważa się, iż procesy te mogą być połączone, zwłaszcza iż obserwuje się je również po przyjęciu klasycznych NSAIDs [3]. Prawdopodobnie wszystkie NSAIDs i selektywne inhibitory COX-2 powodują czasowe zatrzymanie sodu w nerkach, ale tylko u niektórych osób organizm nie adaptuje się do tego stanu, co prowadzi do powstania obrzęku [71]. Przyjmowanie celekoksibu i rofekoksibu nie wpłynęło na inne parametry funkcjonalne nerek [33, 44].

Ekspresja COX-2 zachodzi również w układzie rozrodczym, gdzie ważną rolę odgrywają produkowane przez nią prostaglandyny (porównaj w części I w: *Myszy z nieaktywnymi genami kodującymi COX-1 lub COX-2*). Efekty przyjmowania selektywnych inhibitorów COX-2 przez kobiety nie są znane, ale nie zaleca się ich przyjmowania w czasie ciąży [71].

Selektywne inhibitory COX-2 nie są wolne od efektów ubocznych, niemniej jednak stosunek wad i zalet wydaje się wypadać na ich korzyść.

## PARACETAMOL: SELEKTYWNY INHIBITOR CYKLOOKSYGENAZY-3?

Paracetamol (acetaminofen) jest Niesteroidowym Lekiem Przeciwwzapalnym o silnych właściwościach przeciwbólowych i przeciwgorączkowych, ale wbrew nazwie grupy leków, do których należy, o słabych właściwościach przeciwwzapalnych [5, 6, 75]. Paracetamol obniża poziom metabolitów prostaglandyn wydalanych z moczem, ale nie obniża produkcji PG przez płytki krwi i komórki błony śluzowej przewodu pokarmowego [6]. Ponadto nie powoduje uszkodzeń błony śluzowej żołądka i dwunastnicy jak inne nieselektywne dla COX-2 NSAIDs. Stwierdzono, iż paracetamol nie powoduje uszkodzeń błony śluzowej przewodu pokarmowego dzięki temu, iż powoduje zwiększenie produkcji PGE<sub>2</sub> i PGI<sub>2</sub> [14, 90] oraz najprawdopodobniej usuwa wolne rodniki hydroksylowe [6]. Lek ten może natomiast powodować uszkodzenia wątroby przy dziennej dawce większej niż 10 g, podczas gdy dla osób dorosłych zalecaną dawką jest 4 g [5]. Pomimo powszechnego użycia paracetamolu mechanizm jego działania nie został do dzisiaj jednoznacznie wyjaśniony. Wiadomo, iż powoduje on w warunkach *in vitro* tylko nieznaczne zahamowanie produkcji PG oraz aktywności

COX-1 i COX-2 [6]. Aczkolwiek ma tylko znikome właściwości przeciwzapalne, to istnieją doniesienia o jego skuteczności, podobnej do aspiryny, w zmniejszaniu opuchlizny po operacjach dentystrycznych [6, 77]. W badaniach na modelach zwierzęcych pokazano, iż paracetamol może działać przeciwzapalnie tylko wówczas, gdy jest użyty w dużych dawkach (z  $ED_{50}$  kilkukrotnie większym niż  $ED_{50}$  aspiryny) [5].

Zaobserwowano, iż w małych stężeniach paracetamol stymuluje, a w dużych hamuje syntezę prostaglandyn [6, 68]. Obniżenie produkcji PG można tłumaczyć współzawodnictwem z substratem, kwasem arachidonowym o wiązanie z centrum katalitycznym COX [6]. Natomiast mechanizm stymulacji produkcji PG jest trudniej wytłumaczyć, choć jest on obserwowany również w przypadku niektórych NSAIDs (np. aminopiryny, fenylobutazonu). Zaobserwowano, iż niskie stężenia słabych inhibitorów COX stymulują syntezę PG, gdy dostępność kwasu arachidonowego jest ograniczona [79].

Zaobserwowano również, iż zahamowanie produkcji PG przez paracetamol jest ograniczone tylko do niektórych tkanek (mózgu, śledziony, nerek i płuc), podczas gdy nie dochodzi do niego w płytkach krwi i komórkach błony śluzowej żołądka [6]. Wszystkie powyższe cechy paracetamolu wskazują na to, iż różni się on zasadniczo od pozostałych NSAIDs i nie wyjaśniają, dlaczego jest analgetykiem i lekiem przeciwgorączkowym, ale nie przeciwzapalnym. Jako możliwe wytłumaczenie zaproponowano, iż skoro paracetamol jest tylko słabym inhibitorem obu poznanych izoform COX, to być może ma zdolność do hamowania jakiejś innej, trzeciej odmiany tego enzymu [5, 6, 75, 103]. Wskazówki na istnienie COX-3 pochodzą również z badań nad zjawiskiem wygaszania odczynu zapalnego opłucnej, indukowanego u myszy przez podanie karrageniny (porównaj w części I: *Przeciwzapalna aktywność cyklooksygenazy: COX-2 czy COX-3?*) [25, 26]. Skuteczne zastosowanie paracetamolu w powyższym modelu dałoby ważną wskazówkę do dalszych badań.

Ważne obserwacje dotyczące selektywności paracetamolu pochodzą również z badań na mysiej linii komórek makrofagowych J774.2 [61, 74]. W komórkach tych wywołano aktywność COX, która była hamowana przez paracetamol w stopniu większym, niż blokuje on COX-1 i COX-2 [75]. Interesujące jest to, iż aktywność tę wywołała inkubacja z diklofenakiem, nieselektywnym inhibitorem COX (porównaj tab. 3) [61]. Ponieważ dawka diklofenaku była wystarczająco duża, aby zahamować zarówno COX-1, jak i COX-2, autorzy spekulowali, iż indukcja ta mogła być krokiem mającym na celu uratowanie komórki od letalnego w skutkach zahamowania wszelkiej aktywności COX. W takim wypadku indukowana w krytycznych warunkach izoforma COX mogłaby mieć nową, odmienną aktywność katalityczną (COX-3) [75]. Pokazano również, iż trzecia aktywność COX była hamowana przez sam diklofenak i inne NSAIDs, gdy zostały użyte w znacznie większych dawkach niż potrzebne dla zahamowania COX-1 i COX-2 w komórkach J774.2 [74]. Co bardzo ważne, aspiryna, nie hamująca COX-2, nie zablokowała również COX-3. Wskazuje to, iż trzecia izoforma COX byłaby strukturalnie zbliżona do COX-2 lub byłaby jej wariantem katalitycznym [75].

Indukcja trzeciej aktywności COX w komórkach J774.2 może zajść w wyniku aktywacji PPAR (ang. *peroxisome proliferator activated receptor*) przez NSAIDs, jak pokazano w przypadku COX-2 [46, 47]. W przeciwieństwie do COX-2, w wyniku aktywności katalitycznej tej izoformy nie dochodzi do produkcji PGE<sub>2</sub> [61, 74]. Podobne zjawisko obserwowano w trakcie odczynu zapalnego opłucnej wywołanego przez karrageninę, kiedy to ekspresji trzeciej odmiany COX towarzyszyła produkcja nie PGE<sub>2</sub>, ale 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ<sub>2</sub> (metabolitu PGD<sub>2</sub>), która jest naturalnym agonistą receptorów PPAR- $\gamma$  [26]. Aktywacja tych receptorów jest związana z odpowiedzią przeciwzapalną prowadzącą do wygaszenia odczynu zapalnego (porównaj w części I: *Przeciwzapalna aktywność cyklooksigenazy: COX-2 czy COX-3?*).

### Przewidywania na przyszłość

Jeżeli powyższa hipoteza wskazująca na istnienie trzeciej, przeciwzapalnej cyklooksigenazy jest prawdziwa, to może mieć to poważne implikacje dla przyjmowania selektywnych inhibitorów COX-2 i paracetamolu. Selektywne inhibitory COX-2, celekoksib i rofekoksib, są zatwierdzone do użytku w trakcie reumatoidalnego zapalenia (kości i) stawów, które są chorobami chronicznymi [29, 88]. Przebieg odczynu zapalnego chronicznego charakteryzuje się okresami wzmożonej aktywności choroby i okresami remisji [103]. Przyjmowanie selektywnych inhibitorów COX-2 i paracetamolu, choć korzystne w czasie okresów aktywności choroby, może zahamować wystąpienie okresów remisji chronicznego stanu zapalnego. W tym świetle niezbędne wydaje się wzmoczenie poszukiwań markerów okresów aktywności choroby w celu zaniechania przyjmowania tych leków, gdy markery będą zanikały, umożliwiając naturalne wejście w fazę remisji odczynu zapalnego [103].

Zaobserwowano również korelację pomiędzy wygaszaniem odczynu zapalnego a indukcją niektórych białek stresu, w tym oksygenazy hemowej-1 (ang. *heme oxygenase-1*; HO-1; hsp32) i niektórych innych członków rodziny hsp70 [102, 104]. Pokazano, iż związek wywołujący ekspresję HO-1 promował wygaszanie zapalenia, natomiast inhibitor działał prozapalnie [104]. Potencjalne zastosowanie tego zjawiska, być może w połączeniu z modulacją aktywności COX-2 i COX-3, mogłoby poszerzyć dotychczasowe rozwiązania terapeutyczne.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ANAND BS, ROMERO JJ, SANDUJA SK, LICHTENBERGER LM. Phospholipid association reduces the gastric mucosal toxicity of aspirin in human subjects. *Am J Gastroenterol* 1999; **94**: 1818-1822.
- [2] BARRIOS JM, LICHTENBERGER LM. Role of biliary phosphatidylcholine in bile acid protection and NSAID injury of the ileal mucosa in rats. *Gastroenterology* 2000; **118**: 1179-1186.
- [3] BENSEN WG, FIECHTNER JJ, MCMILLEN JI, ZHAO WW, YU SS, WOODS EM, HUBBARD RC, ISAKSON PC, VERBURG KM, GEIS GS. Treatment of osteoarthritis with celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor: a randomized controlled trial. *Mayo Clin Proc* 1999; **74**: 1095-1105.
- [4] BOMBARDIER C, LAINE L, REICIN A, SHAPIRO D, BURGOS-VARGAS R, DAVIS B, DAY R, FERRAZ MB, HAWKEY CJ, HOCHBERG MC, KVIEN TK, SCHNITZER TJ. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 2000; **343**: 1520-1528, 1522.

TABELA 3. Selektywne i nieselektywne inhibitory cyklooksygenaz uszeregowane według stosunku  $IC_{50} \text{COX-1}/IC_{50} \text{COX-2}$ 

SELEKTYWNOŚĆ NSAIDs*, **	
COX-1	COX-2
	SC-5766 SC-58125 Flosulid
	Nabumeton NS-398 Rofekoksib
	Celekoksib
	Meloksikam
	Naproksen Diklofenak
	Indometacyna Aspiryna Sulindak
Piroksikam	

\*selektywność oznaczano w warunkach *in vitro* i *ex vivo*; \*\*[21, zmodyfikowane]

- [5] BOTTING R. Paracetamol-inhibitable COX-2. *J Physiol Pharmacol* 2000; **51**: 609-618.
- [6] BOTTING RM. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? *Clin Infect Dis* 2000; **31**: S202-210.
- [7] BROOKS P, EMERY P, EVANS JF, FENNER H, HAWKEY CJ, PATRONO C, SMOLEN J, BREEDVELD F, DAY R, DOUGADOS M, EHRICH EW, GIJON-BANOS J, KVIEN TK, VAN RIJSWIJK MH, WARNER T, ZEIDLER H. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Rheumatology (Oxford)* 1999; **38**: 779-788.
- [8] CANDELLI M, CARLONI E, ARMUZZI A, CAMMAROTA G, OJETTI V, PIGNATARO G, SANTOLIQUIDO A, POLA R, POLA E, GASBARRINI G, GASBARRINI A. Role of sucralfate in gastrointestinal diseases. *Panminerva Med* 2000; **42**: 55-59.
- [9] CANNON GW, CALDWELL JR, HOLT P, MCLEAN B, SEIDENBERG B, BOLOGNESE J, EHRICH E, MUKHOPADHYAY S, DANIELS B. Rofecoxib, a specific inhibitor of cyclooxygenase 2, with clinical efficacy comparable with that of diclofenac sodium: results of a one-year, randomized, clinical trial in patients with osteoarthritis of the knee and hip. Rofecoxib Phase III Protocol 035 Study Group. *Arthritis Rheum* 2000; **43**: 978-987.
- [10] CATELLA-LAWSON F, MCADAM B, MORRISON BW, KAPOOR S, KUJUBU D, ANTES L, LASSETER KC, QUAN H, GERTZ BJ, FITZGERALD GA. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; **289**: 735-741.

- [11] CRYER B, FELDMAN M. Effects of very low dose daily, long-term aspirin therapy on gastric, duodenal, and rectal prostaglandin levels and on mucosal injury in healthy humans. *Gastroenterology* 1999; **117**: 17-25.
- [12] CULLEN D, BARDHAN KD, EISNER M, KOGUT DG, PEACOCK RA, THOMSON JM, HAWKEY CJ. Primary gastroduodenal prophylaxis with omeprazole for non-steroidal anti-inflammatory drug users. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; **12**: 135-140.
- [13] DAJANI EZ, AGRAWAL NM. Prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastroduodenal ulcers: role of mucosal protective and gastric antisecretory drugs. *Dig Dis* 1995; **13**: 48-61.
- [14] DANON A, LEIBSON V, ASSOULINE G. Effects of aspirin, indomethacin, flufenamic acid and paracetamol on prostaglandin output from rat stomach and renal papilla *in-vitro* and *ex-vivo*. *J Pharm Pharmacol* 1983; **35**: 576-579.
- [15] DAVIES NM, ROSETH AG, APPELYARD CB, MCKNIGHT W, DEL SOLDATO P, CALIGNANO A, CIRINO G, WALLACE JL. NO-naproxen vs. naproxen: ulcerogenic, analgesic and anti-inflammatory effects. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; **11**: 69-79.
- [16] DRESER H. Pharmakologisches über Aspirin (Acetylsalicylsäure). *Pflügers Arch* 1899; **76**: 306-318.
- [17] EHRICH EW, SCHNITZER TJ, MCILWAIN H, LEVY R, WOLFE F, WEISMAN M, ZENG Q, MORRISON B, BOLOGNESE J, SEIDENBERG B, GERTZ BJ. Effect of specific COX-2 inhibition in osteoarthritis of the knee: a 6 week double blind, placebo controlled pilot study of rofecoxib. Rofecoxib Osteoarthritis Pilot Study Group. *J Rheumatol* 1999; **26**: 2438-2447.
- [18] ELLIOTT SN, MCKNIGHT W, CIRINO G, WALLACE JL. A nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug accelerates gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology* 1995; **109**: 524-530.
- [19] EVERTS B, WAHRBORG P, HEDNER T. COX-2-Specific inhibitors – the emergence of a new class of analgesic and anti-inflammatory drugs. *Clin Rheumatol* 2000; **19**: 331-343.
- [20] FIORUCCI S, ANTONELLI E, BURGAUD JL, MORELLI A. Nitric oxide-releasing NSAIDs: a review of their current status. *Drug Saf* 2001; **24**: 801-811.
- [21] FOSSLIE E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 in neoplasia. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2000; **37**: 431-502.
- [22] FUJIHARA CK, MALHEIROS DM, DONATO JL, POLI A, DE NUCCI G, ZATZ R. Nitroflurbiprofen, a new nonsteroidal anti-inflammatory, ameliorates structural injury in the remnant kidney. *Am J Physiol* 1998; **274**: F573-579.
- [23] FUTAKI N, TAKAHASHI S, KITAGAWA T, YAMAKAWA Y, TANAKA M, HIGUCHI S. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by NS-398 in endotoxin shock rats *in vivo*. *Inflamm Res* 1997; **46**: 496-502.
- [24] GIERSE JK, MCDONALD JJ, HAUSER SD, RANGWALA SH, KOBOLDT CM, SEIBERT K. A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J Biol Chem* 1996; **271**: 15810-15814.
- [25] GILROY DW, COLVILLE-NASH PR. New insights into the role of COX 2 in inflammation. *J Mol Med* 2000; **78**: 121-129.
- [26] GILROY DW, COLVILLE-NASH PR, WILLIS D, CHIVERS J, PAUL-CLARK MJ, WILLOUGHBY DA. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999; **5**: 698-701.
- [27] GILROY DW, TOMLINSON A, WILLOUGHBY DA. Differential effects of inhibition of isoforms of cyclooxygenase (COX-1, COX-2) in chronic inflammation. *Inflamm Res* 1998; **47**: 79-85.
- [28] GIRAUD MN, MOTTA C, ROMERO JJ, BOMMELAER G, LICHTENBERGER LM. Interaction of indomethacin and naproxen with gastric surface-active phospholipids: a possible mechanism for the gastric toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Biochem Pharmacol* 1999; **57**: 247-254.
- [29] GOODMAN SB. Use of COX-2 specific inhibitors in operative and nonoperative management of patients with arthritis. *Orthopedics* 2000; **23**: S765-768.
- [30] HAWKEY CJ. COX-2 inhibitors. *Lancet* 1999; **353**: 307-314.
- [31] HAWKEY CJ, KARRASCH JA, SZCZEPANSKI L, WALKER DG, BARKUN A, SWANNELL AJ, YEOMANS ND. Omeprazole compared with misoprostol for ulcers associated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Omeprazole versus Misoprostol for NSAID-induced Ulcer Management (OMNIUM) Study Group. *N Engl J Med* 1998; **338**: 727-734.
- [32] HAWKINS C, HANKS GW. The gastroduodenal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a review of the literature. *J Pain Symptom Manage* 2000; **20**: 140-151.

- [33] HENNEKENS CH. Update on aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease. *Am Heart J* 1999; **137**: S9-S13.
- [34] HILL SJ, GANELLIN CR, TIMMERMAN H, SCHWARTZ JC, SHANKLEY NP, YOUNG JM, SCHUNACK W, LEVI R, HAAS HL. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev* 1997; **49**: 253-278.
- [35] HULL M, LIEB K, FIEBICH BL. Anti-inflammatory drugs: a hope for Alzheimer's disease? *Expert Opin Investig Drugs* 2000; **9**: 671-683.
- [36] INCE A. The use of COX-2-specific inhibitors: is it all hype or is it evidence based? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001; **56**: M136-137.
- [37] JACK DB. One hundred years of aspirin. *Lancet* 1997; **350**: 437-439.
- [38] JONES R. Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present, and future. *Am J Med* 2001; **110**: S4-S7.
- [39] JÓZEFOWSKI S, MARCINKIEWICZ J. Biosynteza oraz właściwości immunomodulacyjne lipoksyn – metabolitów kwasu arachidonowego. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 335-350.
- [40] KOLACZKOWSKA E, SHAHZIDI S, SELJELID R, van ROOIJEN N, PLYTYCZ B. Early vascular permeability in murine experimental peritonitis is co-mediated by resident peritoneal macrophages and mast cells: crucial involvement of macrophage-derived cysteinyl-leukotrienes. *Inflammation* 2002; **26**: 61-71.
- [41] KOMHOFF M, GRONE HJ, KLEIN T, SEYBERTH HW, NUSING RM. Localization of cyclooxygenase-1 and -2 in adult and fetal human kidney: implication for renal function. *Am J Physiol* 1997; **272**: F460-468.
- [42] LANE NE. Pain management in osteoarthritis: the role of COX-2 inhibitors. *J Rheumatol* 1997; **24**: 20-24.
- [43] LANGENBACH R, MORHAM SG, TIANO HF, LOFTIN CD, GHANAYEM BI, CHULADA PC, MAHLER JF, DAVIS BJ, LEE CA. Disruption of the mouse cyclooxygenase 1 gene. Characteristics of the mutant and areas of future study. *Adv Exp Med Biol* 1997; **407**: 87-92.
- [44] LANGMAN MJ, JENSEN DM, WATSON DJ, HARPER SE, ZHAO PL, QUAN H, BOLOGNESE JA, SIMON TJ. Adverse upper gastrointestinal effects of rofecoxib compared with NSAIDs. *Jama* 1999; **282**: 1929-1933.
- [45] LANZO CA, BEECHEM JM, TALLEY J, MARNETT LJ. Investigation of the binding of isoform-selective inhibitors to prostaglandin endoperoxide synthases using fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 1998; **37**: 217-226.
- [46] LEDWITH BJ, PAULEY CJ, WAGNER LK, ROKOS CL, ALBERTS DW, MANAM S. Induction of cyclooxygenase-2 expression by peroxisome proliferators and non-tetradecanoylphorbol 12,13-myristate-type tumor promoters in immortalized mouse liver cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 3707-3714.
- [47] LEHMANN JM, LENHARD JM, OLIVER BB, RINGOLD GM, KLIEWER SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 1997; **272**: 3406-3410.
- [48] LICHTENBERGER LM. Where is the evidence that cyclooxygenase inhibition is the primary cause of nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced gastrointestinal injury? Topical injury revisited. *Biochem Pharmacol* 2001; **61**: 631-637.
- [49] LICHTENBERGER LM, ROMERO JJ, DE RUIJTER WM, BEHBOD F, DARLING R, ASHRAF AQ, SANDUJA SK. Phosphatidylcholine association increases the anti-inflammatory and analgesic activity of ibuprofen in acute and chronic rodent models of joint inflammation: relationship to alterations in bioavailability and cyclooxygenase-inhibitory potency. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; **298**: 279-287.
- [50] LICHTENBERGER LM, ROMERO JJ, GIBSON GW, BLANK MA. Effect of bisphosphonates on surface hydrophobicity and phosphatidylcholine concentration of rodent gastric mucosa. *Dig Dis Sci* 2000; **45**: 1792-1801.
- [51] LICHTENBERGER LM, ULLOA C, VANOUS AL, ROMERO JJ, DIAL EJ, ILLICH PA, WALTERS ET. Zwitterionic phospholipids enhance aspirin's therapeutic activity, as demonstrated in rodent model systems. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; **277**: 1221-1227.
- [52] LIPSKY LP, ABRAMSON SB, CROFFORD L, DUBOIS RN, SIMON LS, VAN DE PUTTE LB. The classification of cyclooxygenase inhibitors. *J Rheumatol* 1998; **25**: 2298-2303.
- [53] LIPSKY PE, ISAKSON PC. Outcome of specific COX-2 inhibition in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1997; **24**: 9-14.

- [54] LUONG C, MILLER A, BARNETT J, CHOW J, RAMESHA C, BROWNER MF. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol* 1996; **3**: 927-933.
- [55] MALKI SA, YEOMANS ND. Is it time to adopt proton pump inhibitors in the prevention of non-steroidal anti-inflammatory drug gastropathy? *Dig Liver Dis* 2000; **32**: 209-210.
- [56] MIZUNO H, SAKAMOTO C, MATSUDA K, WADA K, UCHIDA T, NOGUCHI H, AKAMATSU T, KASUGA M. Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology* 1997; **112**: 387-397.
- [57] MORRISON BW, CHRISTENSEN S, YUAN W, BROWN J, AMLANI S, SEIDENBERG B. Analgesic efficacy of the cyclooxygenase-2-specific inhibitor rofecoxib in post-dental surgery pain: a randomized, controlled trial. *Clin Ther* 1999; **21**: 943-953.
- [58] MORTEAU O. Prostaglandins and inflammation: the cyclooxygenase controversy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2000; **48**: 473-480.
- [59] MUSCARA MN, WALLACE JL. Nitric Oxide. V. Therapeutic potential of nitric oxide donors and inhibitors. *Am J Physiol* 1999; **276**: G1313-1316.
- [60] NEEDLEMAN P, MANNING PT. Interactions between the inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) pathways: implications for therapeutic intervention in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999; **7**: 367-370.
- [61] PANG L, HOULT JR. Induction of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in endotoxin-activated J774 macrophages is differentially regulated by indomethacin: enhanced cyclooxygenase-2 protein expression but reduction of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 1996; **317**: 151-155.
- [62] PAYA M, GARCIA PASTOR P, COLOMA J, ALCARAZ MJ. Nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase pathways in the inflammatory response induced by zymosan in the rat air pouch. *Br J Pharmacol* 1997; **120**: 1445-1452.
- [63] RASKIN JB. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory therapy. *Am J Med* 1999; **106**: 3S-12S.
- [64] RASKIN JB, WHITE RH, JACKSON JE, WEAVER AL, TINDALL EA, LIES RB, STANTON DS. Misoprostol dosage in the prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric and duodenal ulcers: a comparison of three regimens. *Ann Intern Med* 1995; **123**: 344-350.
- [65] REUTER BK, ASFAHA S, BURET A, SHARKEY KA, WALLACE JL. Exacerbation of inflammation-associated colonic injury in rat through inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1996; **98**: 2076-2085.
- [66] RIENDEAU D, CHARLESON S, CROMLISH W, MANCINI JA, WONG E, GUAY J. Comparison of the cyclooxygenase-1 inhibitory properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and selective COX-2 inhibitors, using sensitive microsomal and platelet assays. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; **75**: 1088-1095.
- [67] RIENDEAU D, PERCIVAL MD, BOYCE S, BRIDEAU C, CHARLESON S, CROMLISH W, ETHIER D, EVANS J, FALGUEYRET JP, FORD-HUTCHINSON AW, GORDON R, GREIG G, GRESSER M, GUAY J, KARGMAN S, LEGER S, MANCINI JA, O'NEILL G, OUELLET M, RODGER IW, THERIEN M, WANG Z, WEBB JK, WONG E, CHAN CC, ET AL. Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol* 1997; **121**: 105-117.
- [68] ROBAK J, WIECKOWSKI A, GRYGLEWSKI R. The effect of 4-acetamidophenol on prostaglandin synthetase activity in bovine and ram seminal vesicle microsomes. *Biochem Pharmacol* 1978; **27**: 393-396.
- [69] ROSSAT J, MAILLARD M, NUSSBERGER J, BRUNNER HR, BURNIER M. Renal effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition in normotensive salt-depleted subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1999; **66**: 76-84.
- [70] SALVEMINI D, SETTLE SL, MASFERRER JL, SEIBERT K, CURRIE MG, NEEDLEMAN P. Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an *in vivo* analysis. *Br J Pharmacol* 1995; **114**: 1171-1178.
- [71] SCHNITZER TJ. Cyclooxygenase-2-specific inhibitors: are they safe? *Am J Med* 2001; **110**: 46S-49S.
- [72] SCHWARTZ JJ, CHAN CC, MUKHOPADHYAY S, MCBRIDE KJ, JONES TM, ADCOCK S, MORITZ C, HEDGES J, GRASING K, DOBRATZ D, COHEN RA, DAVIDSON MH, BACHMANN KA, GERTZ BJ. Cyclooxygenase-2 inhibition by rofecoxib reverses naturally occurring fever in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1999; **65**: 653-660.



- [73] SILVERSTEIN FE, FAICH G, GOLDSTEIN JL, SIMON LS, PINCUS T, WHELTON A, MAKUCH R, EISEN G, AGRAWAL NM, STENSON WF, BURR AM, ZHAO WW, KENT JD, LEFKOWITH JB, VERBURG KM, GEIS GS. Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *Jama* 2000; **284**: 1247-1255.
- [74] SIMMONS DL, BOTTING RM, ROBERTSON PM, MADSEN ML, VANE JR. Induction of an acetaminophen-sensitive cyclooxygenase with reduced sensitivity to nonsteroid antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 3275-3280.
- [75] SIMMONS DL, WAGNER D, WESTOVER K. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, acetaminophen, cyclooxygenase 2, and fever. *Clin Infect Dis* 2000; **31**: S211-218.
- [76] SIMON LS, WEAVER AL, GRAHAM DY, KIVITZ AJ, LIPSKY PE, HUBBARD RC, ISAKSON PC, VERBURG KM, YU SS, ZHAO WW, GEIS GS. Anti-inflammatory and upper gastrointestinal effects of celecoxib in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Jama* 1999; **282**: 1921-1928.
- [77] SKJELBRED P, ALBUM B, LOKKEN P. Acetylsalicylic acid vs paracetamol: effects on post-operative course. *Eur J Clin Pharmacol* 1977; **12**: 257-264.
- [78] SMITH WL, DEWITT DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immunol* 1996; **62**: 167-215.
- [79] SWINNEY DC, MAK AY, BARNETT J, RAMESHA CS. Differential allosteric regulation of prostaglandin H synthase 1 and 2 by arachidonic acid. *J Biol Chem* 1997; **272**: 12393-12398.
- [80] SZCZEKLIK A, NIZANKOWSKA E. Clinical features and diagnosis of aspirin induced asthma. *Thorax* 2000; **55**: S42-44.
- [81] SZCZEKLIK A, NIZANKOWSKA E, BOCHENEK G, NAGRABA K, MEJZA F, SWIERCZYNSKA M. Safety of a specific COX-2 inhibitor in aspirin-induced asthma. *Clin Exp Allergy* 2001; **31**: 219-225.
- [82] SZCZEKLIK A, SANAK M. Genetic mechanisms in aspirin-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**: S142-146.
- [83] TAHA AS, HUDSON N, HAWKEY CJ, SWANNELL AJ, TRYE PN, COTTRELL J, MANN SG, SIMON TJ, STURROCK RD, RUSSELL RI. Famotidine for the prevention of gastric and duodenal ulcers caused by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *N Engl J Med* 1996; **334**: 1435-1439.
- [84] TAKAHASHI S, SHIGETA J, INOUE H, TANABE T, OKABE S. Localization of cyclooxygenase-2 and regulation of its mRNA expression in gastric ulcers in rats. *Am J Physiol* 1998; **275**: G1137-1145.
- [85] TAKEUCHI K, SUZUKI K, YAMAMOTO H, ARAKI H, MIZOGUCHI H, UKAWA H. Cyclooxygenase-2 selective and nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastric mucosal responses. *J Physiol Pharmacol* 1998; **49**: 501-513.
- [86] TEN WOLDE S, DIJKMANS BA, JANSSEN M, HERMANS J, LAMERS CB. High-dose ranitidine for the prevention of recurrent peptic ulcer disease in rheumatoid arthritis patients taking NSAIDs. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; **10**: 347-351.
- [87] TULUNAY FC. NSAIDs: behind the mechanisms of action. *Funct Neurol* 2000; **15**: 202-207.
- [88] URBAN MK. COX-2 specific inhibitors offer improved advantages over traditional NSAIDs. *Orthopedics* 2000; **23**: S761-764.
- [89] VAN HECKEN A, SCHWARTZ JI, DEPRE M, DE LEPELEIRE I, DALLOB A, TANAKA W, WYNANTS K, BUNTINX A, ARNOUT J, WONG PH, EBEL DL, GERTZ BJ, DE SCHEPPER PJ. Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2000; **40**: 1109-1120.
- [90] VAN KOLFSCHOTEN AA, HAGELEN F, VAN NOORDWIJK J. Indomethacin and paracetamol: interaction with prostaglandin synthesis in the rat stomach. *Eur J Pharmacol* 1982; **84**: 123-125.
- [91] VANE JR. The fight against rheumatism: from willow bark to COX-1 sparing drugs. *J Physiol Pharmacol* 2000; **51**: 573-586.
- [92] VANE JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971; **231**: 232-235.
- [93] VANE JR, BOTTING RM. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998; **104**: 2S-8S; discussion 21S-22S.
- [94] WALLACE JL. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology* 1997; **112**: 1000-1016.
- [95] WALLACE JL. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. *Am J Med* 2001; **110**: 19S-23S.

- [96] WALLACE JL. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. *Am J Med* 2001; **110**: S19-S23.
- [97] WALLACE JL, MCKNIGHT W, REUTER BK, VERGNOLLE N. NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology* 2000; **119**: 706-714.
- [98] WALLACE JL, MCKNIGHT W, WILSON TL, DEL SOLDATO P, CIRINO G. Reduction of shock-induced gastric damage by a nitric oxide-releasing aspirin derivative: role of neutrophils. *Am J Physiol* 1997; **273**: G1246-1251.
- [99] WALLACE JL, MILLER MJ. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 2000; **119**: 512-520.
- [100] WARNER TD, GIULIANO F, VOJNOVIC I, BUKASA A, MITCHELL JA, VANE JR. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full *in vitro* analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 7563-7568.
- [101] WHELTON A. Renal aspects of treatment with conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs versus cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am J Med* 2001; **110**: 33S-42S.
- [102] WILLIS D, MOORE AR, WILLOUGHBY DA. Heme oxygenase isoform expression in cellular and antibody-mediated models of acute inflammation in the rat. *J Pathol* 2000; **190**: 627-634.
- [103] WILLOUGHBY DA, MOORE AR, COLVILLE-NASH PR. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 2000; **355**: 646-648.
- [104] WILLOUGHBY DA, MOORE AR, COLVILLE-NASH PR, GILROY D. Resolution of inflammation. *Int J Immunopharmacol* 2000; **22**: 1131-1135.
- [105] YEOMANS ND, TULASSAY Z, JUHASZ L, RACZ I, HOWARD JM, VAN RENSBERG CJ, SWANNELL AJ, HAWKEY CJ. A comparison of omeprazole with ranitidine for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. Acid Suppression Trial: Ranitidine versus Omeprazole for NSAID-associated Ulcer Treatment (ASTRONAUT) Study Group. *N Engl J Med* 1998; **338**: 719-726.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 22.02.2002 r.*

*Przyjęto: 19.04.2002 r.*

*Adres autora: 30-060 Krtaków, ul. R. Ingardena 6*

*E-mail: kolac@zuk.iz.uj.edu.pl*

## WPLYW WANADU NA GOSPODARKE CUKROWA ORGANIZMU I PRZEBIEG INNYCH PROCESÓW KOMÓRKOWYCH

### INFLUENCE OF VANADIUM ON SUGAR METABOLISM AND OTHER PROCESSES IN THE CELL

Dariusz DZIGA

Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Roślin  
Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii UJ, Kraków

*Streszczenie:* Zainteresowanie potencjalną rolą związków wanadu w leczeniu ludzi wynika z interesujących i obiecujących wyników badań z zastosowaniem tego pierwiastka, a dotyczących przede wszystkim jego własności insulino-naśladowczych. Spośród własności biologicznych najważniejsza wydaje się być zdolność pochodnych wanadu do normalizacji szeregu parametrów zaburzonych w cukrzycy. Polega ona na minimalizowaniu podstawowych zaburzeń chorobowych, takich jak: hyperglikemia, hyperlipidmia czy zmniejszona wrażliwość tkanek na insulinę, oraz całościowym regulowaniu metabolizmu cukrów i lipidów, jak też cofaniu wtórnych objawów choroby. Ponadto, oprócz obserwowanej aktywności insulino-podobnej, związki wanadu badane są pod względem zastosowania w szerszym aspekcie, gdyż są efektywne w regulacji rozmaitych procesów komórkowych. Doświadczenia prowadzone z zastosowaniem wanadu wykazały jego udział w regulacji apoptozy, proliferacji i transformacji nowotworowej, w kontrolowaniu stężenia jonów w komórce i aktywacji odpowiedzi immunologicznej. Większość ze znanych efektów działania pochodnych wanadu opiera się na ich zdolności do hamowania fosfataz i stymulowania aktywności kinaz, enzymów kluczowych w utrzymaniu równowagi pomiędzy procesami fosforylacji i defosforylacji w komórce. W związku z tym istnieje możliwość szerokiego stosowania omawianych związków w regulacji znacznej ilości szlaków metabolicznych. Ponadto związki wanadu, ze względu na powszechność stosowania w licznych doświadczeniach, stają się narzędziem do badań procesów komórkowych, szczególnie tych, w których istotną rolę odgrywają kinazy i fosfatazy.

*Słowa kluczowe:* wanad, cukrzyca, fosfatazy, kinazy

*Summary:* The potential role of vanadium compounds in human therapy promises an interesting study in the use of this element, in particular as an insulin-mimetic agent. Among many other biological properties, the most important is the capability of vanadium compounds to normalise several parameters disturbed in diabetes mellitus. Vanadium decreases both blood glucose and lipids to normal levels, insulin resistance of target tissues and regulates many processes that are included in sugar and lipids metabolism.

Besides insulin-mimetic activities, vanadium compounds are studied from others aspect because they are effective in the regulation of various processes in the cell. Vanadium has been used in several studies as a regulator of apoptosis, proliferation, cancer development or immunological responses. Most of these effects are a direct result of phosphatase inhibition or kinase activation by vanadium. These are key enzymes that control the phosphorylation and dephosphorylation ratio in the cell so vanadium compounds could be useful in the regulation of many important metabolic processes. Regardless of their ultimate success or failure as therapeutic agents, vanadium continues to be a useful probe of enzyme structure and function in a number of biological processes.

*Key words:* vanadium, diabetes, phosphatases, kinases

*Stosowane skróty:* pV – nadtlenek wanadu, VOSO<sub>4</sub> – siarczan wanadylu, VO(ma)<sub>2</sub> – maltolan wanadylu, VO(ka)<sub>2</sub> – kojan wanadylu, VAc – acetyloaceton wanadylu, IR – receptor insuliny, IRS-1 – substrat receptora insuliny, PTP – fosfataza fosfotyrozyny, PI3-K – 3-kinaza fosfatydyloinozytolu, STZ – streptozotocyna, TGN – powierzchnia trans aparatu Golgiego, IP<sub>3</sub> – trójfosforan inozytolu, PIP<sub>3</sub> – trójfosforan fosfatydyloinozytolu, GLUT-4 – białko transportujące glukozę.

## 1. WSTĘP

Wanad wykazuje aktywność insulino-naśladowczą w cukrzycy doświadczalnej i klinicznej, która przejawia się zdolnością do normalizowania szeregu parametrów morfologicznych, biochemicznych i klinicznych zmienionych w tej chorobie. Pochodne wanadu są zdolne do przywrócenia normalnego poziomu cukru we krwi i poprawy gospodarki cukrowo-lipidowej w organizmie, regulacji aktywności kluczowych enzymów związanych z transdukcją sygnału od insuliny, zwiększenia wrażliwości tkanek docelowych na hormon. Mechanizm działania tych związków opiera się między innymi na hamowaniu lub stymulacji aktywności enzymów (kinaz i fosfataz) włączonych w szlaki metaboliczne związane z przemianami cukrów i tłuszczu. Aktywność pochodnych wanadu oraz proponowane mechanizmy ich działania opisywane są w licznych pracach przeglądowych [3, 4, 33, 41, 42, 46, 55].

Wśród licznie stosowanych związków wanadu wyróżnia się kompleksy nieorganiczne i organiczne. Do pierwszej grupy należą siarczan wanadylu – VOSO<sub>4</sub>, wanadany sodu – Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, NaVO<sub>3</sub> [24, 29, 32, 36, 44, 54, 56, 64, 70] i szereg nadtlenków wanadu (pVs), powstałych w wyniku różnorodnych reakcji wanadu z wodą utlenioną [13, 18, 25, 38, 60, 72, 75]. Druga grupa związków to wanad związany z różnymi organicznymi ligandami, które ułatwiają pokonanie bariery błony plazmatycznej i dostarczenie pierwiastka do wnętrza komórki. Należą tu na przykład szczawian wanadylu i pochodne związane koordynacyjnie z maltolem, jako maltolan wanadylu – (VO(ma)<sub>2</sub>), kwasem kojowym jako kojan wanadylu – (VO(ka)<sub>2</sub>), bipirydylem czy acetyloacetonem (VAc) [5, 23, 58, 73, 74]. Ponadto testowane są kolejne związki, takie jak: bis(pikolinato)-oksowanad(V) [19, 35], bis(biguanidato)oksowanad(IV) i inne pochodne biguanidów [69] oraz kompleksy wanadu z L-cysteiną i N-glicyną [31]. Należy zaznaczyć, że prowadzono już kliniczne „leczenie” wybranymi związkami wanadu ochotników chorych na cukrzycę [27, 32].

## 2. MECHANIZM DZIAŁANIA RÓŻNYCH POCHODNYCH WANADU W CUKRZYCY

Wanadany mogą aktywować kinazę tyrozynową, będącą domeną cytoplazmatyczną receptora insuliny (IR), przez zahamowanie aktywności fosfatazy tyrozynowej (PTP), znanego inhibitora kinaz [63]. Następuje to prawdopodobnie przez tworzenie odwracalnych kompleksów z grupami tiolowymi. Natomiast nadtlutki wanadu (pVs) całościowo oddziałują na aktywność fosfataz tyrozynowych i/lub kinaz [60]. Jest prawdopodobne, że wpływ związków pVs na fosforylację tyrozyn docelowych białek jest adekwatny do ich zdolności do hamowania wewnątrzkomórkowych PTPs.

Nie ma jednego, uniwersalnego mechanizmu molekularnego działania wanadu, ale większość jego pochodnych powoduje wzrost poziomu ufosforylowanej tyrozyny receptora insuliny i jego aktywację. Różnice w efektywności działania insuliny i wanadu na poszczególne parametry (np. stymulację pobierania glukozy, syntezę glikogenu, utlenianie glukozy itp.) mogą być tłumaczone przez różny sposób oddziaływania na receptor insuliny przez te dwa związki. Wanad stymuluje jedynie fosforylację tyrozyny, podczas gdy insulina powoduje również fosforylację seryny i treoniny zlokalizowanych na podjednostce  $\beta$  receptora. Wanad także aktywnie oddziałuje na liczne receptory i ligandy w różnych typach komórek, przez zwiększenie liczby receptorów wewnątrz komórki i hamowanie degradacji kompleksu ligand-receptor, takie działanie wykazuje m.in. na receptory insuliny. Ortowanadan sodu reguluje degradację kompleksu ligand-receptor u zwierząt cukrzycowych, prawdopodobnie przez hamowanie PTP, blokując przeniesienie tego kompleksu do lizosomów i podwyższając liczbę receptorów insuliny w błonach, w porównaniu ze zwierzętami nieleczonymi [32, 56]. W nowotworowych komórkach wątroby (gdzie liczba receptorów insuliny jest znacznie podwyższona), podawanie wanadu i insuliny normalizuje ten parametr przez redukcję transkrypcji genów receptora i obniżenie poziomu mRNA [9]. Należy zwrócić uwagę na poznany niedawno udział endosomów w przekazie sygnału od insuliny, co zostało związane omówione w jednej z prac przeglądowych [7]. Okazuje się, że gromadzenie kompleksów receptor-insulina w tym przedziale komórkowym odgrywa istotną rolę w przekazie sygnału na substrat receptora insuliny (IRS-1) w regionach komórki odległych od błony plazmatycznej. Wykazano, że jedna z pochodnych pV hamuje fosfatazę związaną z błonami endosomów i przez to wydłuża aktywność kinazy IR.

Proponowane są liczne modele wyjaśniające mechanizm hamowania PTPs, wiadomo, że różne pochodne inaczej oddziałują na ten enzym. Wanad, ale także molibden i wolfram, występując w komórce w formie jonów mogą hamować fosfatazy tyrozynowe poprzez naśladowanie tetraedrycznej geometrii jonów fosforu [55, 75]. Stała dysocjacji kompleksu enzym-inhibitor jest jednak większa niż dla pary fosfor-PTP, dlatego sugeruje się, że te jony metalu mogą tworzyć z enzymem innego rodzaju kompleksy. Zarówno wanad, jak i molibden wiążą się z centrum aktywnym fosfatazy [75] i w obrębie tego regionu można zaobserwować małe, ale znaczące zmiany łańcucha, mimo że ogólna struktura białka nie zmienia się. PTP ma w centrum aktywnym

konserwatywne aminokwasy – cysteinę i asparaginę. Związki pV hamują enzym poprzez utlenianie cys12, co powoduje, że fosfataza nieodwracalnie traci swoje funkcje katalityczne [75]. Natomiast jedna z pochodnych, podobna strukturalnie do związków pV wykazuje całkowicie odwracalne hamowanie, spontanicznie reagując z centrum aktywnym PTP [51, 52]. Na podstawie modelowania molekularnego wykazano duże powinowactwo tego związku do PTP, tworzącego z enzymem silne wiązania wodorowe przy udziale asparaginy, stabilizowane dodatkowo oddziaływaniami hydrofobowymi [51]. Wykazano także [13], że wanad (pV) poprzez aktywację kinazy tyrozynowej powoduje silną fosforylację transbłonowej fosfatazy, wbudowanej w błony komórkowe i mającej dwie domeny cytoplazmatyczne.

Jak wynika z powyższego zestawienia, zdolność hamowania fosfatazy tyrozynowej przez różne pochodne jest prawdopodobnie związana z dużym powinowactwem związków wanadu do enzymu, przy czym znaczna ilość odmian PTPs może być w większym lub mniejszym stopniu wrażliwa na działanie różnorodnych form wanadu, jakie są dostarczane do komórki.

Związki wanadu mogą działać także niezależnie od receptora insuliny wywołując insulino-podobne efekty przez aktywację cytozolowej formy kinazy [63]. W tym przypadku wanad obniża oporność tkanek na insulinę u zwierząt chorych na cukrzycę, zwiększa liczbę receptorów insuliny i ich wrażliwość na hormon, to wszystko bez zmian w aktywności receptorowej kinazy [8]. Ponadto, niezależnie od insuliny, wanad może wpływać na zmiany pH komórki, regulować stężenie jonów wapnia [28, 43, 53] i zwiększać aktywność białek MAP [5, 39]. Te alternatywne drogi działania wanadu mogą odgrywać istotną rolę w takich komórkach jak adipocyty, w których jest o 60% mniej receptorów IR, a ponadto są one mniej wrażliwe na hormon. Wówczas wanad może być bardziej efektywny niż insulina, gdyż włącza odmienne drogi przekazu sygnału [3].

Oprócz znanych kinaz aktywowanych przez wanad stwierdzono niedawno obecność niereceptorowej błonowej kinazy białkowej w szczurzych adipocytach, która jest związana z antylipolityczną aktywnością i pobieraniem glukozy i jest wrażliwa na stymulowanie wanadem [29]. Sugeruje się, że po podaniu wanadanu kinaza ta jest aktywowana przez autofosforylację i oddziałuje na kinazę 3-fosfatydyloinozytolową (PI3-K). Istnienie takiego enzymu może wyjaśnić, w jaki sposób wanad aktywuje PI3-K bez aktywacji receptora insuliny i fosforylacji IRS-1. Badania te wskazują, w jaki sposób wanad zmniejsza oporność tkanek na insulinę, wywołując efekt przez mechanizm niezależny od hormonu [29], gdyż w stanach cukrzycowych aktywność niereceptorowej kinazy nie jest znacząco zmieniona.

3-kinaza fosfatydyloinozytolu jest istotnym enzymem na drodze stymulacji wanadem niezależnej od receptora insuliny. Aktywacja tej kinazy indukuje m.in. translokację transporterów GLUT-4 do błony plazmatycznej adipocytów i zwiększenie pobierania glukozy [48]. Taka aktywacja kinazy pod wpływem wanadu zachodzi w wyniku interakcji i utworzenia kompleksu między podjednostką p85 $\alpha$  enzymu z IRS-1 [48]. Długotrwałe podawanie wanadyli może chronić też przed obniżeniem aktywności i

poziomu transporterów GLUT-4 w komórkach mięśnia sercowego, które w cukrzycy wywołanej streptozotocyną (STZ) wykazują zmniejszone pobieranie glukozy [44]. Normalizujące działanie wanadu polega w tym wypadku na podwyższeniu poziomu mRNA transporterów i ochronie przed obniżeniem ich ilości w komórkach. Także pochodne organiczne tego pierwiastka poprawiają parametry związane z glikolizą w wątrobie poprzez regulację kluczowych enzymów (glukokinazy i kinazy pirogronianowej) na poziomie mRNA [38].

Jedna z pochodnych pV wykazuje wyraźny insulino-naśladowczy efekt na procesy pobierania glukozy w adipocytach pacjentów z cukrzycą typu II (insulinoniezależną), chociaż stymulacja pobierania glukozy w komórkach osobników chorych jest wyraźnie niższa zarówno przy podawaniu wanadu, jak i insuliny w porównaniu z komórkami kontrolnymi [72]. Mimo podniesionego poziomu fosforylacji tyrozyny receptora insuliny, badany związek wanadu nie zmienia stymulowanego insuliną pobierania glukozy. W tym modelu doświadczalnym wanad nie poprawia wrażliwości i zdolności odpowiedzi na insulinę komórek adipocytów, a oporność na insulinę nie jest związana z zakłóceniami fosforylacji kinaz tyrozynowych receptora [72].

Z kolei badania Dehghani i wsp. sugerują [24], że siarczan wanadyliu nie może samodzielnie normalizować poziomu cukru we krwi zwierząt z cukrzycą STZ. Dopiero w obecności niewielkiej dawki insuliny następuje przywrócenie euglikemii, przy czym ilość potrzebnego hormonu jest znacznie mniejsza niż w przypadku terapii czysto insulinowej. To dowodzi, że normalizacja poziomu cukru we krwi pod wpływem działania wanadu nie jest niezależna od insuliny osocza. Minimalna jej dawka jest wymagana do skutecznego działania tego pierwiastka, którego aktywność może polegać na zwiększeniu wrażliwości obwodowych tkanek na insulinę, co jest prawdopodobnie dodatkowym działaniem wanadu, manifestowanym przy obniżonym poziomie hormonu. [15, 24].

Doświadczenia oparte na badaniach morfologicznych wykazały, że pochodne wanadu mogą zapobiegać postępującemu pogarszaniu się stanu komórek trzustki w cukrzycy wywołanej STZ, poprzez zniesienie hipersekrecyjnej odpowiedzi komórek po podaniu STZ [69]. To zahamowanie wydzielania insuliny przez trzustkę nie jest zależne od redukcji poziomu glukozy we krwi i może być bezpośrednim efektem zmian w komórkach  $\beta$ . Samo podawanie insuliny nie powoduje regeneracji komórek  $\beta$ , choć normalizuje ich metabolizm i tempo wzrostu [25], natomiast podawanie wanadu wspólnie z insuliną cofa rozwój choroby i prowadzi do euglikemii także po całkowitym zaprzestaniu leczenia, poprzez poprawę funkcji sekrecyjnych komórek odpowiedzialnych za wydzielanie insuliny [14, 25]. Podobnie pozytywny efekt działania wykazuje wanad w komórkach wątrobowych szczurów z cukrzycą wywołaną STZ [23], gdzie już po tygodniu leczenia  $\text{VO}(\text{ma})_2$  następuje poprawa morfologii i funkcji sekrecyjnych aparatu Golgiego oraz przywrócenie normalnej aktywności transferazy galaktozylowej, enzymu biorącego udział w modyfikacji potranslacyjnej białek, która w „nieleczony” cukrzycy jest znacząco obniżona [23].

$\text{VO}(\text{ma})_2$  wykazuje także znaczącą poprawę dysfunkcji serca będących wtórnymi zaburzeniami w chorobie cukrzycowej, a związanych z zaburzeniami metabolizmu

cukrów i lipidów [73]. Poprawa homeostazy glukozy jest przy tym pozytywnie skorelowana z poprawą funkcji tego organu, co świadczy o tym, że  $\text{VO}(\text{ma})_2$  działa skutecznie także w komórkach mięśnia sercowego. W komórkach mięśniowych i endotelium aorty wanadany, podobnie jak insulina, uczestniczą w stymulacji cykazy adenylowej, poprzez wpływ na kinazę tyrozynową [66]. Efekt rozszerzenia naczyń, wywołany podniesieniem aktywności enzymu, jest podobny po stymulacji zarówno wanadem, jak i insuliną.

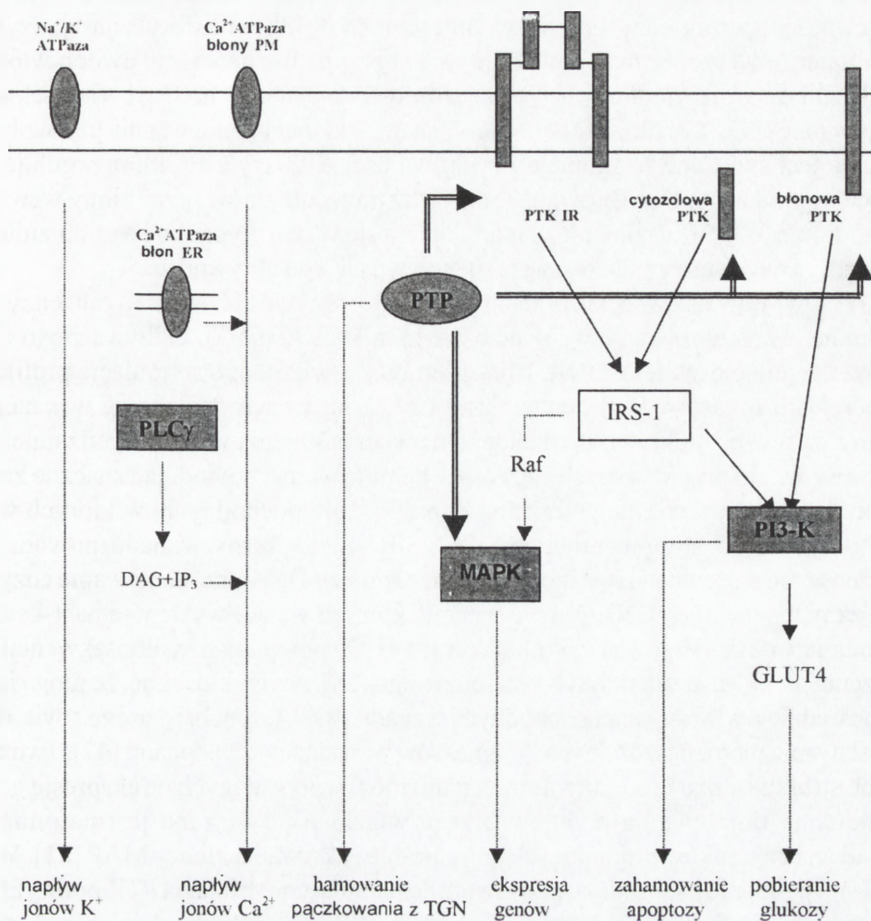
Wobec przytoczonych przykładów można wnioskować, że aktywność hormonu i wanadu pokrywa się nie tylko na szlakach związanych z metabolizmem cukrów. Działanie pochodnych wanadu nie ogranicza się do normalizacji stężenia cukru we krwi, lecz także poprawia szereg innych parametrów zmienionych w cukrzycy.

### 3. UDZIAŁ WANADU W RÓŻNORODNYCH PROCESACH KOMÓRKOWYCH

Ostatnie lata badań wykazały, że działanie biologiczne wanadu nie ogranicza się jedynie do aktywności insulino-naśladowczej, lecz dotyczy regulacji różnorodnych procesów komórkowych, takich jak: ekspresja DNA [6, 31], apoptoza [16, 71], odpowiedź immunologiczna [28, 57], powstawanie nowotworów [6, 31]. W związku z tym zwiększają się możliwości stosowania różnych jego pochodnych jako czynników terapeutycznych w rozmaitych stanach chorobowych.

Podjmowane są próby stosowania związków wanadu jako czynników antynowotworowych. Na przykład kompleks wanad(III) z L-cysteiną jest w niskich dawkach skutecznym środkiem przeciwdziałającym eksperymentalnie indukowanemu nowotworowi u szczurów [31], co objawia się znaczącym przedłużeniem życia, cofnięciem rozwoju raka i ograniczeniem efektu działania karcynogenów. Badania Bishayee i wsp. wskazują, że ochrona komórek, w tym wypadku hepatocytów, przez wanad może być realizowana przez podniesienie poziomu detoksykacji prokarcynogenów lub hamowanie ich aktywacji, a zatem ograniczenie ich wiązania z DNA [6]. Związane jest to z wpływem na enzymy i zmianą metabolicznego procesu choroby przez zastosowanie pochodnej wanadu [6]. Ponieważ w komórkach nowotworowych istnieją bardzo swoiste warunki środowiskowe (szczególnie jeśli chodzi o pH i poziom wolnych rodników), w zależności od nich wanad może działać bardzo odmiennie. W niektórych stanach ortowanadany wykazują aktywność zarówno promującą, jak i inicjującą transformację komórek nowotworowych [61]. W obecności estrów forbolu i innych karcynogenów powodują istotne zmiany w komórkach transformowanych, ale bez ich obecności nie wykazują działania. Białka fosforylowane przez te czynniki (także przy udziale wanadu) mogą być kluczowymi w indukowanej chemicznie transformacji nowotworowej.





RYCINA 1. Przykładowe miejsca działania pochodnych wanadu w komórce. Białka, z którymi oddziałuje wanad, zaznaczono ciemnym kolorem; stosowane skróty: PTK cytosolowa – niebłonowa kinaza tyrozynowa, PTK błonowa – nireceptorowa błonowa kinaza tyrozynowa, PTK IR – kinaza receptora insuliny, PTP – fosfataza tyrozynowa, PI3-K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolowa, MAPK – kinaza białkowa aktywowana przez mitogeny, GLUT-4 – transportery glukozy, IRS-1 – substrat receptora insuliny, Raf – kinaza białkowa ser/treo, PLCy – fosfolipaza C $\gamma$ , DAG – diacyloglicerol, IP $_3$  – trifosforan inozytolu; szczegółowe objaśnienia w tekście, opracowano na podstawie [2, 12, 28, 29, 33, 42, 43, 53, 58]

Zwiększenie poziomu wanadu w diecie badanych zwierząt może oddziaływać na odpowiedź immunologiczną przez zmiany w aktywności i liczbie makrofagów. Wynika to prawdopodobnie z inhibicji PTP i w konsekwencji podniesienia poziomu fosforylacji białek [60] oraz z podwyższenia stężenia jonów wapnia w limfocytach T, co decyduje o aktywacji komórek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej [28].

Innym przejawem aktywności związków wanadu jest regulacja wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, poprzez oddziaływanie na różne etapy kaskady

sygnału związanej z białkową kinazą C [28, 43, 53]. Podawanie związku pV indukuje uwalnianie  $\text{Ca}^{2+}$  z puli wewnątrzkomórkowej i zwiększenie ich stężenia w różnych typach komórek, między innymi w limfocytach T [28]. Fosforylacja tyrozynowa fosfolipazy C $\gamma$  przez wanad powoduje w tym przypadku generację dwóch wtórnych przekazników – diacyloglicerolu (DAG) i trójfosforanu inozytolu ( $\text{IP}_3$ ) i w konsekwencji napływ jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Natomiast w komórkach trzustki uwalnianie wapnia pod wpływem wanadu jest związane ze zmianami w aktywności ATP-azy  $\text{Ca}^{2+}$ , która reguluje ilość jonów wapnia w komórce prowadząc aktywny transport jonów przez błony wewnątrzkomórkowe [43, 53]. Działanie wanadu opiera się w tym wypadku na utlenianiu grup sulfhydrylowych enzymu, co znacząco wpływa na jego aktywność.

Przez wpływ na procesy bioenergetyczne i aktywność rozmaitych enzymów, pochodne wanadu mogą decydować o dalszym losie komórki. Odbywa się to często poprzez regulację syntezy DNA. Między innymi stwierdzono stymulację proliferacji komórek fibroblastów [30] i osteoblastów [17], przy czym badania te wskazują, że istotny wpływ na efektywność działania ma stan utlenienia wanadu i rodzaj nośnika. Badane związki przy wyższych stężeniach hamują wzrost powodując znaczne zmiany w morfologii komórek, najwyraźniejsze po podaniu pochodnych, w których wanad występuje na +5 stopniu utlenienia [17, 30]. Takie formy wanadu powodują, w zależności od stężenia, wzrost lub hamowanie syntezy DNA oraz hamowanie enzymów związanych z syntezą DNA [31]. Formy, w których wanad występuje na +4 stopniu utlenienia, mogą reagować z komórkowym  $\text{H}_2\text{O}_2$  powodując w konsekwencji uszkodzenia nici kwasu dezoksyrybonukleinowego [38]. Niewykluczone, że mogą istnieć bezpośrednie oddziaływania pochodnych wanadu z DNA, tym bardziej że stwierdzono powstawanie nierozpuszczalnych kompleksów wanadanów z histonami [47]. Tworzenie takich struktur może być jednym z mechanizmów wpływających na ekspresję genów.

Indukcja dojrzewania oocytów przez związki pV związana jest natomiast ze stymulacją czynników promujących dojrzewanie i aktywacją kinazy MAP [21]. Wanad działa tu, podobnie jak insulina, przeciwnie do hamującego działania PTP, podwyższając stężenie trójfosforanu fosfatydyloinozytolu ( $\text{PIP}_3$ ), produktu działania 3-kinazy fosfatydyloinozytolowej ( $\text{PI3-K}$ ), która jest efektem receptora insuliny. Aktywację kinaz MAP stwierdzono też w komórkach endotelium [39], w których wanadany działają podobnie jak niektóre czynniki wzrostu (IL-1, TGF), indukując ekspresję białek COX-2 z rodziny cyklooksygenaz. Także antyapoptotyczny efekt podawania wanadu jest związany z aktywacją  $\text{PI3-K}$  [16] i skierowaniem komórek na drogę przeżycia, co wynika nie tyle ze stymulacji proliferacji, lecz z zatrzymania fazy G2 cyklu komórkowego. Inne prace wskazują na wanad jako czynnik promujący apoptozę, a jego działanie, mające służyć eliminacji komórek z uszkodzonym DNA, opiera się na podniesieniu poziomu syntezy reaktywnych czynników utleniających [71].

Z powyższych przykładów wynika, że wanad może wywoływać w komórkach różnorakie efekty, często przeciwstawne, jak indukcja lub hamowanie rozwoju nowotworu czy też stymulacja apoptozy lub działanie antyapoptotyczne. Taka niespecyficzność bardzo ogranicza możliwość zastosowania omawianych związków w tak złożonym układzie, jakim jest organizm. Z drugiej strony, w ściśle określonych

warunkach labolatoryjnych (tzn. przy danym rodzaju komórek, w sprecyzowanych warunkach hodowli i znanym stężeniu podawanego związku) działanie danej pochodnej wanadu jest powtarzalne, co umożliwia stosowanie jej jako wzorca w badaniach podstawowych.

#### 4. WANAD JAKO REGULATOR AKTYWNOŚCI KINAZ I FOSFATAZ

Komórkowa odpowiedź na hormony, czynniki wzrostu czy cytokiny w znacznej mierze zachodzi za pośrednictwem aktywacji wewnątrzkomórkowych kinaz. Enzymy te fosforylują tyrozyny swoistych białek, niektóre z nich są przy tym zdolne do autofosforylacji. Pojawianie się w czasie ufosforylowanych białek ma krytyczne znaczenie we właściwym funkcjonowaniu komórki. Ścisła regulacja tych procesów jest związana z obecnością fosfataz, przeprowadzających procesy defosforylacji. Dlatego kluczowa rola pochodnych wanadu polega na ich zdolności do regulacji aktywności tych enzymów i możliwości kontrolowania równowagi między procesami fosforylacji i defosforylacji białek komórkowych. Pojawia się coraz więcej doniesień, że pochodne wanadu są zdolne do wiązania i aktywowania lub hamowania tego rodzaju enzymów związanych nie tylko ze szlakami metabolizmu cukrów i lipidów. Efekty ich działania dotyczą więc także wielu innych procesów życiowych zachodzących wewnątrz komórki.

Dwie pochodne wanadu –  $\text{VOSO}_4$  i  $\text{NaVO}_3$  stymulują pobieranie jonów  $\text{K}^+$  w izolowanych komórkach wątroby szczura przez stymulację pompy ATP-azowej  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  [12]. Badane związki wanadu, być może przez fosforylację tyrozyny, bezpośrednio aktywują ATP-azę  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  lub też, poprzez fosforylację innych białek, regulują aktywność lub liczbę pomp jonowych w komórce. Kinaza MAP oraz rybosomalna kinaza S6, które są istotnymi elementami w kaskadzie fosforylacji indukowanej sygnałem od insuliny, są też aktywowane po podaniu insulino-naśladowczego związku wanadu –  $\text{VOSO}_4$ , który wykazuje przedłużone działanie na aktywność enzymów [37]. W obu przypadkach [12, 37] mechanizm tego typu działania związany jest ze stymulacją kinazy tyrozynowej, gdyż genisteina, inhibitor tej kinazy, blokuje efekt wywołany wanadem.

Pochodne wanadu mogą być istotnym czynnikiem decydującym o skierowaniu komórki na drogę apoptozy lub proliferacji czy też wpływać stymulująco bądź hamująco na transformację nowotworową [6, 31, 61], gdzie równowaga między procesami fosforylacji i defosforylacji odgrywa decydującą rolę. Przykładowo, antyapoptotyczny efekt wywołany przez  $\text{VOSO}_4$  związany jest ze wzrostem aktywności kinazy białkowej B Akt [16] poprzez aktywację PI3-K wanadem (wortmanina, inhibitor tej kinazy, hamuje antyapoptotyczne działanie wanadu).

Możliwość regulacji aktywności PTP zależna jest od stanu redoks komórki [22]. Wanadany mogą wykazywać różną efektywność działania w komórce, zwiększając

TABELA 1. Przykładowe procesy biologiczne, w których stwierdzono zmiany w aktywności kinaz lub fosfataz pod wpływem działania wanadu (opracowano na podstawie cytowanej literatury)

Rodzaj aktywności biologicznej wanadu	Stwierdzony sposób działania		Literatura
	aktywacja kinaz	hamowanie fosfataz	
Aktywacja receptora insuliny Pobieranie glukozy w adipocytach Transport GLUT-4 w kierunku błony plazmatycznej	+ +	+	[60, 63, 75] [48] [48]
Stymulacja białek MAP i ekspresji genów	+		[21, 67]
Zmiany w aktywności i liczbie makrofagów		+	[57]
Stymulacja ATP-azy $\text{Na}^+/\text{K}^+$	+		[12]
Zahamowanie apoptozy	+		[16]
Zmiany w strukturze sieci filamentów aktynowych		+	[68]
Hamowanie sekrecji pęcherzyków ze strony trans aparatu Golgiego		+	[2]

poziom ufosforylowanej tyrozyny tylko w warunkach obniżonego poziomu glutationu, przy czym hamowanie PTP przez wanad, przeciwnie niż w badaniach *in vitro*, jest nieodwracalne [22]. *In situ* wanadan inaktywuje PTP, być może przez tworzenie związków pVs lub innych czynników utleniających. Taka modulacja działania wanadu powoduje, że związki te mogą wykazywać selektywne efekty w komórkach lub ich częściach w zależności od stanu redoks przedziału komórkowego.

Hamowanie fosfatazy przez wanad prawdopodobnie powoduje też zmiany w strukturze sieci filamentów aktynowych oraz hamuje oparty na mikrotubulach mechanizm transportu pęcherzyków [68]. W keratynach, białkach budujących filamety pośrednie, pod wpływem działania pV (podobnie jak po stymulacji czynnikami wzrostu) następuje fosforylacja reszt tyrozyny oraz seryny, co powoduje modulację ich organizacji i interakcji ze związanymi białkami [34]. Procesy fosforylacji i defosforylacji białek są również istotne w tworzeniu pęcherzyków sekrecyjnych z powierzchni trans aparatu

Golgiego (TGN) komórek endokrynych. Cynk i pV jako inhibitory PTP hamują ten proces, a stopień fosforylacji białek i polipeptydów obecnych w TGN jest skorelowany z hamowaniem tworzenia pęcherzyków [2]. Po stymulacji fibroblastów związkami pVs następuje fosforylacja koneksyn, głównie koneksyny 43 budujących kanały odpowiedzialne za bezpośredni kontakt między cytoplazmami sąsiednich komórek [20].

## 5. PRZEMIANY WANADU W KOMÓRCE I ORGANIZMIE

Oprócz insulino-naśladowczych własności opisywanych form wanadu ważną cechą, jeśli chodzi o ewentualne zastosowanie terapeutyczne, jest możliwość swobodnego dostarczenia leku do miejsca jego działania oraz trwałość w komórce i akumulacja tego pierwiastka, który może w większym stężeniu wywoływać niepożądane efekty toksyczne. W dostarczaniu związków wanadu przez bariery skórne bardzo istotne są takie parametry, jak: kształt, rozmiar i lipofilność cząsteczek [10]. Wchłanianie zależy od rozpuszczalności i sposobu podawania pochodnych wanadu. Większość z nich dostarczana jest do organizmu przez układ pokarmowy. W żołądku najczęściej są one zamieniane na dodatnie jony wanadylowe  $VO^{2+}$  (wanad na +4 stopniu utlenienia) i w takiej formie pozostają w alkalicznym środowisku dwunastnicy [2].

Zróżnicowanie w ligandach chelatujących ma ogromny wpływ nie tylko na zdolność wchłaniania, ale i na własności fizykochemiczne różnych związków wanadu. Najlepiej wchłaniane są przez organizm niektóre pochodne nadtlenków wanadu i wanadyli, przy czym, przy podobnej kinetyce wchłaniania, występują między tymi związkami znaczne różnice w zdolności do hamowania PTP [59]. Niektóre pochodne pV są znacznie efektywniejsze w obniżaniu poziomu cukru po podaniu przez skórę niż doustnym [11]. Z kolei organiczne pochodne (wanad koordynacyjnie związany z maltolem lub kwasem kojowym) są znacznie lepiej wchłaniane przez tkanki niż siarczan wanadyli, którego większość jest wydalana przez układ pokarmowy [58, 65, 70, 74]. Charakterystyczne, że nie ma korelacji między poziomem wanadu w tkankach a poprawą parametrów metabolizmu glukozy, co sugeruje, że różnice w efektywności działania poszczególnych związków nie zależą od stopnia absorpcji i stężenia w organizmie, lecz wynikają z własności insulino-naśladowczych, niejednakowych dla różnych pochodnych [58]. W ogólnej przydatności leczniczej istotna jest więc dostępność w komórce i transport do miejsca działania oraz aktywność wewnątrz komórki, czyli przede wszystkim zdolność do oddziaływania z centrum aktywnym enzymów.

Przemiana związków wanadu wewnątrz organizmu prowadzi do powstania głównie formy  $VO^{2+}$ . Jednak zarówno siarczan wanadyli, jak i ortowanadan sodu po wniknięciu do krwinek ulegają częściowemu przekształceniu na kation wanadylowy, i anion wanadanowy, który wewnątrz komórki przechodzi do przedziałów ograniczających obrót pierwiastka. Ta porcja wanadu jest inaczej wydalana z komórki niż ta, która jest akumulowana bezpośrednio w formie wanadyli [40]. Tak więc rodzaj podawanego

związku może mieć wpływ na jego przemiany metaboliczne, co ma zapewne bardzo ważne konsekwencje w obniżeniu toksyczności i w efektywności leczenia.

Wanad zmienia w komórce swój stan utlenienia. We krwi i płynach ustrojowych występuje głównie w formie utlenionej, czyli na +5 stopniu utlenienia jako anion ( $\text{VO}_3^-$  – metawanadan i  $\text{VO}_4^{3-}$  – ortowanadan), a w komórce na +4 – w formie kationu wanadylowego  $\text{VO}^{2+}$  (przemiana następuje prawdopodobnie przez nieenzymatyczną redukcję przy udziale glutationu). W krwi jony wanadylowe wchodzą w kompleksy z białkami – transferyną i albuminą [35, 49]. Kompleks jonu z albuminą surowicy wołowej przedłuża stabilność formy  $\text{V}^{4+}$ , w formie niezwiązanej wanadyl spontanicznie ulega utlenieniu do wanadanu, obecność zredukowanego glutationu (GSH) nie wpływa na tempo tego procesu [49]. Białka lub peptydy *in vivo* przyłączając wanad na +5 stopniu utlenienia powodują redukcję do stanu  $\text{V}^{4+}$  bezpośrednio przez NADPH (pełnią więc rolę taką, jaką *in vitro* spełnia EDTA) [40]. Wiązanie jonu  $\text{VO}^{2+}$  przez peptydy powoduje jego wtórną inaktywację i może być sposobem detoksykacji wanadu [35]. W kościach jony  $\text{VO}^{2+}$  lokują się obok jonów  $\text{Ca}^{2+}$  w hydroksyapatycie. Oddziałują z nieorganiczną frakcją kości, tworząc różne kompleksy z tlenkami fosforu [26, 35]. Uważa się, że jon  $\text{VO}^{2+}$  może być stopniowo uwalniany z tego kompleksu i transportowany do innych organów, gdzie po przekształceniu w inne formy, może powtórnie wykazywać insulino-podobną aktywność [35].

Akumulacja pierwiastka w poszczególnych częściach organizmu jest nierównomierna i zależy od stosowanej w terapii pochodnej, okresu podawania oraz w mniejszym stopniu od stężenia. Największe ilości gromadzą się w kościach, nerkach, śledzionie i wątrobie, znacznie mniej wanadu odkłada się w mięśniach i mózgu [36, 62, 76]. Taka akumulacja niewątpliwie powoduje szeroko opisywane efekty toksyczne [4, 27], objawiające się przede wszystkim większą śmiertelnością komórek, związaną z uszkodzeniami DNA [1, 63]. Jednak wg innych autorów brak jest efektów toksycznych u zwierząt cukrzy-cowych leczonych wanadem, przynajmniej po krótszym okresie podawania [54, 70]. Ponadto, oprócz normalizacji parametrów związanych z metabolizmem cukrów i lipidów, zaobserwowano nawet poprawę stanu komórek mięśnia sercowego [36], trzustki [14, 25] czy wątroby [23] uszkodzonych w wyniku rozwoju cukrzycy.

## 6. ZASTOSOWANIE ZWIĄZKÓW WANADU W BADANIU PROCESÓW BIOLOGICZNYCH

Oprócz opisanych powyżej przykładów zastosowania pochodnych wanadu pojawia się możliwość wykorzystania omawianych związków w badaniach mających na celu wyjaśnienie molekularnych mechanizmów związanych z cukrzycą, w szczególności biologicznych procesów stymulowanych przez insulinę oraz do badania struktury i funkcji enzymów [33]. Publikowane są kolejne prace, w których wykorzystuje się znane własności wanadu – hamowanie aktywności fosfatyz i aktywacja kinaz – w

badaniu różnorodnych zjawisk, między innymi tych związanych z transdukcją sygnału pochodzącego od insuliny [45, 50, 60]. Dzięki jednej z pochodnych pVs stwierdzono istnienie dwóch niezależnych dróg modulujących aktywność syntazy glikogenu, jedna z nich jest niezależna od insuliny [45]. Zastosowanie wanadu jako inhibitora PTP pozwoliło określić udział procesów fosforylacji i defosforylacji w indukowanej  $H_2O_2$  aktywacji fosfolipazy D [50] oraz w procesie tworzenia pęcherzyków sekrecyjnych na powierzchni trans aparatu Golgiego (fosforylacja polipeptydów zlokalizowanych we frakcji błon TGN hamuje ten proces) [2]. Pochodne wanadu mogą też służyć do badania mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie nowotworu [61] czy też, przy wykorzystaniu ich zdolności do regulacji ATP-azy  $Ca^{2+}$ , jako środek farmakologiczny stosowany w mobilizacji jonów wapnia [53].

## LITERATURA

- [1] ALTAMIRANO-LOZANO M, VALVERDE M, ALVAREZ-BARRERA L. Genotoxic studies of vanadium pentoxide ( $V_2O_5$ ) in male mice. Effects in several mouse tissues. *Teratogenesis Carcinog Mutagenen* 1999; **19**: 243-255.
- [2] AUSTIN CD, SHIELDS D. Formation of nascent secretory vesicle from the trans-Golgi network of endocrine cells is inhibited by tyrosine kinase and phosphatase inhibitors. *J Cell Biol* 1996; **135**: 1471-1483.
- [3] BADMAEV V, PRAKASH S, MAJEED M. Vanadium: a review of its potential role in the fight against diabetes. *J Alternative and Complementary Med* 1999; **5**: 273-291.
- [4] BARCELOUX DG. Vanadium. *Clin Toxicol* 1999; **37**: 265-278.
- [5] BHANOT S, GIRN J, POUCHERET P. Effects of bis(maltolato)oxovanadium(IV) on protein serine kinases in skeletal muscle of streptozotocin-diabetes rats. *Mol Cell Biochem* 1999; **202**: 131-140.
- [6] BISHAYEE A, ROY S, CHATTERJEE M. Characterisation of selective induction and alteration of xenobiotic biotransforming enzymes by vanadium during diethylnitrosamine-induced chemical rat liver carcinogenesis. *Oncology Res* 1999; **11**: 41-53.
- [7] BOBESZKO M, BARAŃSKA J. Udział endosomu w transmisji sygnału insulinowego. *Post Biochem* 1998; **44**: 263-265.
- [8] BODEN G, CHEN X, RUIZ J. Effects of vanadyl sulphate on carbohydrate and lipid metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1996; **45**: 1130-1135.
- [9] BORTOLI S, AMESSOU M, COLLINET M. Vanadate, but not insulin, inhibits insulin receptor gene expression in rat hepatoma cells. *Endocrinology* 1997; **138**: 4821-4829.
- [10] BRAND RM, DUENSING G, HAMEL FG. Iontophoretic delivery of an insulin-mimetic peroxovanadium compound. *Int J Pharm* 1997; **146**: 115-122.
- [11] BRAND RM, HAMEL FG. Transdermally delivered peroxovanadium compounds can lower blood glucose levels in diabetic rats. *Int J Pharm* 1999; **183**: 117-123.
- [12] BRUCK R, HALPERN Z, AEED H. Vanadyl ions stimulate  $K^+$  uptake into isolated perfused rat liver via the  $Na^+/K^+$ -pump by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Eur J Physiol* 1998; **435**: 610-616.
- [13] BUIST A, BLANCHETOT CH, HERTOJ J. Involvement of the membrane distal catalytic domain in pervanadate-induced tyrosine phosphorylation of receptor protein-tyrosine phosphatase a. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **267**: 96-102.
- [14] CAM MC, RODRIGUES B, McNEILL JH. Distinct glucose lowering and beta cell protective effects. *Eur J Endocrinol* 1999; **141**: 546-554.
- [15] CAM MC, LI WM, McNEILL JH. Partial preservation of pancreatic beta cells by vanadium: evidence for chronic amelioration of diabetes. *Metabolism* 1997; **46**: 1-11.

- [16] CHIN LS, MURRAY SF, HARTER DH. Sodium vanadate inhibits apoptosis in malignant glioma cells: a role for Akt/PKB. *J Biomed Sci* 1999; **6**: 213-218.
- [17] CORTIZO M, BARRIO DA, ETCHEVERRY SB. Vanadium compounds alter cell proliferation and differentiation on cultured osteoblast-like cells. *Metal Ions Biol Med* 1996; **4**: 294-297.
- [18] CRANS DC, KERAMIDAS AD, HOOVER-LITTY H. Synthesis, structure and biological activity of a new insulinomimetic peroxovanadium compounds: bisperoxovanadium imidazole monoanion. *J Am Chem Soc* 1997; **119**: 5447-5448.
- [19] CRANS DC. Chemistry and insulin-like properties of vanadium (IV) and vanadium (V) compounds. *J Inorg Biochem* 2000; **80**: 123-131.
- [20] CRUCIANI V, MIKALSEN SO. Stimulated phosphorylation of intracellular connexin 43. *Exp Cell Res* 1999; **251**: 285-298.
- [21] CUMMINGS C, ZHU L, SORISKY A. A peroxovanadium compound induces *Xenopus* oocyte maturation: inhibition by a neutralizing anti-insulin receptor antibody. *Dev Biol* 1996; **175**: 338-346.
- [22] CUNCIC C, DETICH N, ETHIER D. Vanadate inhibition of protein tyrosine phosphatases in Jurkat cells: modulation by redox state. *JBIC* 1999; **4**: 354-359.
- [23] DĄBROŚ W, KORDOWIAK AM, DZIGA D. Influence of bis(maltolato)oxovanadium(IV) on activity of galactosyltransferase (GalT) and morphology of rat liver Golgi apparatus in control and streptozotocin diabetes. *Pol J Pathol* 1998; **49**: 67-76.
- [24] DEGHANI GA, AHMADI S, OMRANI GR. Effects of vanadyl sulphate on glucose homeostasis in severe diabetes induced by streptozotocin in rats. *Indian J Med Res* 1997; **106**: 481-485.
- [25] DEGHANI GA, SOTOODEH M, OMRANI GR. Trophic effects of vanadium on beta-cells of STZ-induced insulin dependent diabetic rats. Evidence for long term relief of diabetes mellitus. *Indian J Med Res* 1999; **110**: 70-75.
- [26] DICANOV S.A., LIBOIRON BD, THOMPSON KH. *In vivo* electron spin-echo envelope modulation (ESEEM) spectroscopy: first observation of vanadyl coordination to phosphate in bone. *J Am Chem Soc* 1999; **121**: 11004-11005.
- [27] DOMINGO JL. Vanadium and diabetes. What about vanadium toxicity? *Mol Cell Biochem* 2000; **203**: 185-87.
- [28] EHRING GR, KERSCHBAUM HH, FANGER CM. Vanadate induced calcium signaling, Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel activation, and gene expression in T lymphocytes and RBL-2H3 mast cells via thiol oxidation. *J Immunol* 2000; **164**: 678-687.
- [29] ELBERG G, HE Z, LI J. Vanadate activates membranous nonreceptor protein tyrosine kinase in rat adipocytes. *Diabetes* 1997; **46**: 1684-1690.
- [30] ETCHEVERRY SB, SALICE VC, VESCINA CM. Mitogenicity, cytotoxicity, and morphological changes by vanadium compounds on Swiss 3T3 cells. *Metal Ions BiolMed* 1996; **2**: 298-300.
- [31] EVANGELOU A, KARKABOUNAS S, KALPOUZOS G. Comparison of the therapeutic effects of two vanadium complexes administered at low doses on benzo[a]pyrene-induced malignant tumors in rats. *Cancer Lett* 1997; **119**: 221-225.
- [32] FANTUS IG, GEORGE R, TANG S, CHONG P. The insulin-mimetic agent vanadate promotes receptor endocytosis and inhibits intracellular ligand-receptor degradation by a mechanism distinct from the lysosomotropic agents. *Diabetes* 1996; **45**: 1084-1093.
- [33] FANTUS IG, TSIANI E. Vanadium compounds – biological action and potential as pharmacological agents. *TEM* 1997; **8**: 51-58.
- [34] FENG L, ZHOU X, LIAO J. Pervanadate-mediated tyrosine phosphorylation of keratins 8 and 19 via p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Cell Sci* 1999; **112**: 2081-2090.
- [35] FUKUI K, FUJISAWA Y, OHYA-NISHIGUCHI H. *In vivo* coordination structural changes of a potent insulin-mimetic agents, bis(picolinato)oxovanadium(IV), studied by electron spin-echo envelope modulation spectroscopy. *J Inorg Biochem* 1999; **77**: 215-224.
- [36] HAMEL FG, DUCKWORTH WC. The relationship between insulin and vanadium metabolism in insulin target tissues. *Mol Cell Biochem* 1995; **153**: 95-102.
- [37] HEI J, FARAHAHAKHSHIAN S, CHEN X. Stimulation of MAP kinase and S6 kinase by vanadium and selenium in rat adipocytes. *Mol Cell Biochem* 1998; **178**: 367-375.
- [38] HIORT C, GOODISMAN J, DABRAWIAK JC. Chemically and photochemically initiated DNA cleavage by an insulin-mimetic bisperoxovanadium complex. *Mol Cell Biochem* 1995; **153**: 31-36.
- [39] HIRAI K, EZUMI Y, NISHIDA E. Comparative study of vanadate- and phorbol ester-induced cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 1545-1552.



- [40] KANAMORI K, SAKURAI M, KINOSHITA T. Direct reduction from vanadium(V) to vanadium(IV) by NADPH in the presence of EDTA. A consideration of the reduction and accumulation of vanadium in the ascidian blood cells. *J Inorg Biochem* 1999; **77**: 157-161.
- [41] KHANDELWAL RL, PUGAZHENTHI S. In vivo effects of vanadate on hepatic glycogen metabolizing and lipogenic enzymes in insulin-dependent and insulin-resistant diabetic animals. *Mol Cell Biochem* 1995; **153**: 87-94.
- [42] KIERSZTAN A. Insulinopodobne działanie związków wanadu. *Post Biochem* 1998; **44**: 275-281.
- [43] KIM Y, SAKONG J, CHO K. Vanadate-sensitive microsomal ATPases and microsomal  $45\text{Ca}^{2+}$  uptake in tracheal epithelial cells. *J Biochem* 1998; **124**: 1094-1100.
- [44] KOPP SJ, DAAR J, PAULSON DJ. Effects of oral vanadyl treatment on diabetes-induced alterations in the heart GLUT-4 transporter. *J Mol Cell Cardiol* 1997; **29**: 2355-2362.
- [45] LAVOIE L, BAND CJ, KONG M. Regulation of glycogen synthase in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1999; **274**: 28279-28285.
- [46] McNEILL JH, CAM MC, BROWNSEY RW. Mechanisms of vanadium action: insulin-mimetic or insulin-enhancing agent? *Can J Physiol Pharmacol* 2000; **78**: 829-847.
- [47] MICHELE DE, THOMSEN D, LOUTERS LL. Vanadates form insoluble complexes with histones. *Biochemie* 1997; **79**: 457-462.
- [48] MOLERO JC, MARTINEZ C, ANDRES A. Vanadate fully stimulates insulin-receptor substrate-1 associated phosphotidyl inositol 3-kinase activity in adipocytes from young and old rats. *FEBS Lett* 1998; **425**: 298-304.
- [49] MOTOYASHIKI T, MIYAKE M, YOSHIDA A. A vanadyl sulfate-bovine serum albumin complex stimulates the release of lipoprotein lipase activity from isolated rat fat pads through an increase in the cellular content of cAMP and *myo*-inositol 1,4,5-triphosphate. *Biol Pharm Bull* 1999; **22**: 780-786.
- [50] NATARAJAN V, VEPA S, VERMA RS. Role of protein tyrosine phosphorylation in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced activation of endothelial cell phospholipase D. *Am J Physiol* 1996; **271**: L400-L408.
- [51] NXUMALO F, GLOVER NR, TRACEY AS. Kinetics and molecular modelling studies of the inhibition protein tyrosine phosphatases by N,N-dimethylhydroxylamine complexes of vanadium(V). *SBIC* 1998; **3**: 534-542.
- [52] NXUMALO F, TRACEY AS. Reactions of vanadium(V) complexes of N,N-dimethylhydroxylamine with sulfur-containing ligands: implications for protein tyrosine phosphatase inhibition. *JBIC* 1998; **3**: 527-533.
- [53] PARIENTE JA, LAJAS AI, POZO MJ. Oxidizing effects of vanadate on calcium mobilization and amylase release in rat pancreatic acinar cells. *Biochem Pharmacol* 1999; **58**: 77-84.
- [54] PEPATO MT, MAGNANI MRT, KETTELHUT IC. Effects of oral vanadyl sulfate treatment on serum enzymes and lipids of streptozotocin-diabetic young rats. *Mol Cell Biochem* 1999; **198**: 157-161.
- [55] POUCHERET P, VERMA S, GRYNPAS MD. Vanadium and diabetes. *Mol Cell Biochem* 1998; **188**: 73-80.
- [56] PUGAZHENTHI S, TANHA F, DAHL B. Decrease in protein tyrosine phosphatase activities in vanadate-treated obese Zucker (fa/fa) rat liver. *Mol Cell Biochem* 1995; **153**: 125-129.
- [57] QURESHI MA, HILL CH, HEGGEN CL. Vanadium stimulates immunological responses of chicks. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; **68**: 61-71.
- [58] REUL BA, AMIN SS, BUCHET JP. Effects of vanadium complexes with organic ligands on glucose metabolism: a comparison study in diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1999; **126**: 467-477.
- [59] REULAND DJ, CAO ZX, ROSENHEIN L. The cellular uptake kinetics and acute biological effects of various oxovanadium species: a comparative study. *Horm Metab Res* 1998; **30**: 29-33.
- [60] RUFF SJ, CHEN K, COHEN S. Peroxovanadate induced tyrosine phosphorylation of multiple signaling proteins in mouse liver and kidney. *J Biol Chem* 1997; **272**: 1263-1267.
- [61] SAKAI A. Orthovanadate, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases, acts more potently as a promoter than as an inhibitor in the BALB/3T3 cell transformation. *Carcinogenesis* 1997; **18**: 1395-1399.
- [62] SANCHEZ DJ, COLOMIN MT, DOMINGO JL. Effects of vanadium on activity and learning in rats. *Physiol Behav* 1998; **63**: 345-350.
- [63] SANCHEZ DJ, COLOMINA MT, DOMINGO JL. Prevention by sodium 4,5-dihydroxybenzene-1,3-disulfonate (Tiron) of vanadium-induced behavioral toxicity in rats. *Biol Tr Elem Res* 1999; **69**: 249-259.

- [64] SEKARN, LI J, SHECHTER YM. Vanadium salts as insulin substitutes: mechanism of action, a scientific and therapeutic tool in diabetes mellitus research. *Clin Rev Biochem Mol Biol* 1996; **31**: 339-359.
- [65] SETYAWATI IA, THOMPSON KH, YUEN VG. Kinetic analysis and comparison of uptake, distribution, and excretion of  $^{48}\text{V}$ -labeled compounds in rats. *J Appl Physiol* 1998; **84**: 569-575.
- [66] TAN CM, MACDONALD CJ, CHORAZYCZEWSKI J. Vanadate stimulation of adenylyl cyclase: an index of tyrosin kinase vascular effects. *Clin Pharmacol Ther* 1999; **66**: 275-281.
- [67] WIESE S, SCHLISS F, HAUSSINGER D. Osmotic regulation of MAP-kinase activities and gene expression in H4IIE rat hepatoma cells. *Biol Chem* 1998; **379**: 667-671.
- [68] WOLLERT T, DePINA AS, LANGFORD BM. Effects of vanadate on actin-dependent vesicle motility in extracts of clam oocytes. *Biol Bull* 1999; **197**: 265-266.
- [69] WOO LCY, YUEN VG, THOMPSON KH. Vanadyl-biguanide complexes as potential synergistic insulin mimics. *J Inorg Biochem* 1999; **76**: 251-257.
- [70] YAO J, BATTELL ML, McNEILL JH. Acute and chronic response to vanadium following two methods of streptozotocin-diabetes induction. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; **75**: 83-90.
- [71] YE J, DING M, LEONARD SS. Vanadate induced apoptosis in epidermal JB6 P<sup>+</sup> cells via hydrogen-mediated reactions. *Mol Cell Biochem* 1999; **202**: 9-17.
- [72] YU ZW, JANSSON PA, POSNER PI. Peroxovanadate and insulin action in adipocytes from NIDDM patients. Evidence against a primary defect in tyrosine phosphorylation. *Diabetologia* 1997; **40**: 1197-1203.
- [73] YUEN VG, ORVIG C, McNEILL JH. Improvement of cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats following oral administration of bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can J Physiol Pharmacol* 1993; **71**: 270-276.
- [74] YUEN VG, CARAVAN P, GELMINI L. Glucose-lowering properties of vanadium compounds: comparison of coordination complexes with maltol or kojic acid as ligands. *J Inorg Biochem* 1997; **68**: 109-116.
- [75] ZHANG M, ZHOU M, VAN ETEN RL. Crystal structure of bovine low molecular weight phosphotyrosyl phosphate complexed with the transition state analog vanadate. *Biochemistry* 1997; **36**: 15-23.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 24.01.2002 r.

Przyjęto: 23.04.2002 r.

Adres autora: ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

e-mail: ddziga@mol.uj.edu.pl

## TRANSDUKCJA SYGNAŁÓW W KOMÓRCZE ROŚLINNEJ POD WPLYWEM STRESÓW ABIOTYCZNYCH

ABIOTIC STRESS SIGNALING PATHWAYS IN PLANT CELL

Karolina Stępień

Pracownia Biologii Molekularnej Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

*Streszczenie:* Różnorodność mechanizmów obronnych roślin przeciwko stresom abiotycznym pozwala im na adaptację do niekorzystnych warunków środowiska. Pierwszym etapem adaptacji jest percepcja bodźca, a następnie jego przekazanie na szlak transdukcji sygnałów. Rozpoznanie cząsteczek sygnałowych zachodzi dzięki receptorom obecnym w błonie komórkowej. Przyłączenie liganda do receptora wpływa na jego aktywność enzymatyczną lub na aktywność cząsteczki przekaźnikowej. Ostatnie badania wskazują na uniwersalność mechanizmów transdukcyjnych z udziałem kaskad kinaz MAP łączących różne receptory z różnymi elementami odpowiedzi komórki. Szlaki transdukcyjne stanowią współzależną sieć, określaną jako 'cross-talk'.

*Słowa kluczowe:* transdukcja sygnałów, stesy abiotyczne, receptory, przekaźniki sygnałów, 'cross-talk'

*Summary:* Plants exhibit a variety of responses to abiotic stress that enable them to tolerate and survive adverse conditions. The first step is perceiving the stress as it occurs and to relay information about it through a signal transduction pathway. Signal molecules are recognized by receptors, which are localized on the plasma membrane of the cell. Binding of a ligand can result in the stimulation of an intrinsic enzymatic activity of its receptor or the modulation of transducing protein. Recent studies in plants indicate that mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades have emerged as a universal signal transduction mechanism that connects diverse sensors to cellular and nuclear responses. The signaling pathways constitute a network that is interconnected at many levels, it is called 'cross-talk'.

*Key words:* signal transduction, abiotic stresses, receptors, signal transducers, 'cross-talk'

## 1. WSTĘP

Prawidłowy wzrost i rozwój roślin może zachodzić tylko w odpowiednich warunkach środowiska zewnętrznego. Jego zasadniczymi składowymi są wilgotność powietrza i gleby, temperatura otoczenia, natężenie światła oraz skład chemiczny podłoża. W warunkach naturalnych czynniki środowiska ulegają ustawicznym zmianom, a po przekroczeniu progowych wartości stają się stresowe dla rozwoju rośliny. W niniejszej pracy zostaną omówione mechanizmy odbierania i przekazywania przez komórkę roślinną sygnałów pochodzących ze środowiska.

Pierwszym etapem rozpoczynającym odpowiedź na stres jest percepcja sygnału, a następnym jego transdukcja do wnętrza i wewnątrz komórek. Rezultatem odpowiedzi na stres jest uruchomienie ekspresji genów, których produkty prowadzą do zmian procesów metabolicznych w komórkach i tkankach roślinnych [1, 35].

## 2. TRANSDUKCJA SYGNAŁÓW

Wyróżnia się trzy etapy reakcji komórki na bodźce środowiskowe: percepcja sygnału, jego przenoszenie i odpowiedź końcowa rośliny [79].

### 2.1. Receptory

Receptory, to komórkowe struktury odpowiedzialne za rozpoznawanie i selektywne wiązanie cząsteczek mających właściwości sygnałowe oraz uczestniczące w powstawaniu reakcji wewnątrzkomórkowych [30].

#### 2.1.1. Receptory jonotropowe.

Receptor jonotropowy to receptor połączony z kanałem jonowym. Związanie liganda wywołuje zmiany konformacyjne receptora tak, iż kanał zamyka się albo otwiera dla specyficznych jonów, takich jak:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ . Przepływ jonów w poprzek błony prowadzi do zmian potencjału transbłonowego [79].

Specyficzne skutki ma tu otwarcie kanałów  $\text{Ca}^{2+}$ , ponieważ zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  mogą w sposób istotny wpływać na aktywność wielu enzymów, m.in. uczestniczących w transdukcji sygnałów [30].

#### 2.1.2. Receptory współpracujące z białkiem G (receptory metabotropowe).

Receptory metabotropowe mają siedem transbłonowych fragmentów. Współpracują one z heterotrimerycznymi białkami G. U roślin poznano wiele genów kodujących podjednostki białek G (rozdz. 2.2.1.) [27, 79]. Po związaniu cząsteczki sygnałowej, receptor ulega zmianie konformacyjnej, która odształca cytoplazmatyczną domnę receptora, umożliwiając mu oddziaływanie z białkiem G, umieszczonym po stronie cytozolowej błony komórkowej. Receptor pozostaje aktywny tak długo, jak długo jest

z nim związana zewnątrzkomórkowa cząsteczka sygnalizacyjna i przez to może katalizować aktywację wielu cząsteczek białka G [79].

### 2.1.3. Receptory o aktywności enzymatycznej (receptory katalityczne)

Receptory katalityczne są białkami transbłonowymi, których domeny wiążące ligandy są eksponowane na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej. Jednakże domena cytoplazmatyczna w receptorze katalitycznym działa jak enzym lub tworzy kompleks z innym białkiem o aktywności enzymatycznej [30, 70]. Do tej grupy receptorów należą m.in. receptorowe kinazy białkowe.

Roślinne kinazy receptorowe mają jeden lub kilka regionów transbłonowych. W regionie katalitycznym mogą mieć reszty histydynowe, treoninowe lub serynowo-tyrozynowe [70]. Typowa kinaza receptorowa u roślin ma cztery regiony strukturalne: region odbierający bodźce z otoczenia; domena zewnątrzkomórkowa; region transbłonowy; domena kinazowa [<http://www.wisc.edu/prkr/>].

Obecnie wiadomo, że kinazy receptorowe należą do dużej rodziny genów i w przypadku poznanego już genomu *Arabidopsis* stanowią prawie 2,5% wszystkich genów, jest to w przybliżeniu 600 genów [<http://www.wisc.edu/prkr/>].

**2.1.3.1. Receptorowe kinazy serynowo-treoninowe.** Roślinne receptorowe kinazy serynowo-treoninowe są grupą białek zlokalizowanych w błonie komórkowej. Uczestniczą w regulacji rozwoju roślin, jak i w percepcji bodźców pochodzących z otoczenia, np. światło [3]. Kinazy te są klasyfikowane ze względu na obecność charakterystycznej domeny, znajdującej się w części zewnątrzkomórkowej białka. Większość kinaz serynowo-treoninowych zawiera sekwencje bogate w powtórzenia leucynowe LRR (ang. *Leucine Rich Repeat*) odgrywających istotną rolę w interakcjach białko-białko [34, 82]. Inna grupa zawiera tzw. domenę S podobną do SLG (ang. *S-Locus Glycoprotein*), ponadto mogą również występować, m.in. takie, które mają analogię do motywu występującego w czynniku rozwoju nabłonka – EGF (ang. *Epidermal Growth Factor, EGF-like motif*) czy też w czynniku TNFR (ang. *Tumor Necrosis Factor Receptor-like motif*) lub tzw. domenę wiążącą lektyny [3, 4, 19]. Dotychczas nie zidentyfikowano w roślinie receptorowej kinazy serynowo-treoninowej, biorącej udział w percepcji i transdukcji sygnałów związanych ze stresami abiotycznymi.

Przykładem kinazy serynowo-treoninowej jest ERECTA1, białko mające w swojej domenie pozakomórkowej region LRR. ERECTA1 ulega ekspresji w apikalnej części merystemów, a jego mutacja prowadzi do wstrzymania kwitnienia lub powoduje rozwój skróconych strąków i ogonków liściowych. Prawdopodobny jest też udział tej kinazy w przekazywaniu sygnałów z komórki do komórki podczas rozwoju merystemu [82].

Jak dotychczas u roślin nie zidentyfikowano receptorowych kinaz tyrozynowych, jednakże jedna z poznanych kinaz-PRK1 (ang. *Pollen Receptor-like Kinase 1*) ma reszty zarówno serynowo-treoninowe, jak i tyrozynowe [54].

**2.1.3.2. Receptorowe kinazy histydynowe.** Receptorowe kinazy histydynowe zbudowane są z dwóch elementów, sensora i regulatora odpowiedzi. Sensor wiążący sygnał ze środowiska zewnętrznego zawiera kinazę histydynową, która po zadziałaniu

bodźca ulega autofosforylacji. Następnie grupa fosforanowa przeniesiona zostaje na reszty asparagianinu, znajdujące się w domenie regulatora odpowiedzi [83]. Pobudzona cząsteczka kinazy receptorowej działa aktywująco na inne białka występujące w kaskadach sygnalizacyjnych, a w konsekwencji wpływa na ekspresję specyficznych, indukowanych określonym bodźcem – stresem, genów. Dobrze poznaną receptorową kinazą histydynową jest ATHK1 (ang. *Arabidopsis thaliana Histidine Kinase 1*) oraz receptor etylenowy ETR1. Badania nad białkiem ATHK1 wykazały, że reaguje ono na zmiany osmotyczne środowiska. Receptor odbierający sygnały na zasadzie osmosensora, w dalszym etapie przekazuje sygnał do kaskady MAP kinaz (ang. *Mitogen Activated Protein Kinases*) [7, 20, 41, 51, 83].

Obecnie niewiele wiadomo na temat receptorów roślinnych, które odbierają bodźce pochodzące z otoczenia. W przypadku niskich temperatur sama plazmalemma może brać udział w percepcji sygnału. Pod wpływem chłodu może dojść do zwiększenia płynności błon, jest to wtórna reakcja na obniżoną temperaturę wynikająca z desaturacji kwasów tłuszczowych [61, 69]. Przypuszcza się, że w błonie istnieje receptor wrażliwy na zmiany w jej płynności. Inną możliwością zaproponowaną przez Monroy'a i Dhindsa [52] jest kanał wapniowy, który mógłby pełnić rolę receptora, chociaż dotychczas kanał  $\text{Ca}^{2+}$  o takiej funkcji nie został zidentyfikowany. Zgodnie z tą hipotezą kanały  $\text{Ca}^{2+}$  otwierałyby się wtedy, gdy zwiększa się płynność błon komórkowych pod wpływem niskiej temperatury otoczenia. Z kolei otwarcie kanałów wapniowych aktywowałoby transdukcję sygnałów uruchamiających ekspresję określonych genów [61].

## 2.2. Przenośniki sygnałów

### 2.2.1. Białko G

Białko G jest jednym z najlepiej poznanych przenośników sygnałów wewnątrz komórki. W przypadku receptorów współpracujących z białkiem G, związanie przez receptor sygnału powoduje aktywację białka G, które wpływa na regulację kanałów błonowych oraz uruchomienie aktywności cykazy adenylanowej, AC (ang. *Adenylyl Cyclase*) i fosfolipaz C i D, PLC i PLD (z ang. *PhosphoLipase C*, *PhosphoLipase D*) [64, 70, 76].

Białko G jest heterotrimerem złożonym z trzech podjednostek  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . W stanie niepobudzonym podjednostka  $\alpha$  jest związana z GDP, a cząsteczka białka G znajduje się w stanie spoczynkowym. Związanie zewnątrzkomórkowego liganda przez receptor, powoduje połączenie receptora z białkiem G i jego aktywację, która polega na wymianie GDP na GTP w podjednostce  $\alpha$ . W wyniku tego procesu następuje rozdzielenie się białka G na zaaktywowaną podjednostkę  $\alpha$  i na kompleks podjednostek  $\beta\gamma$ . Podjednostka  $\alpha$  dyfunduje następnie wzdłuż cytozolowej powierzchni błony komórkowej aż do napotkania jej białka docelowego [27, 30, 56, 64].

### 2.2.2. Fosfolipazy

Katabolizm fosfolipidów pełni szczególną rolę w funkcjonowaniu komórki i wpływa na wiele procesów, takich jak: reorganizacja i degradacja błon, wytwarzanie

przełączników drugiego rzędu [58, 69]. Fosfolipazy biorące udział w przemianach fosfolipidów, pogrupowane są w klasy w zależności od rodzaju substratu i miejsca ich reakcji. Na tej podstawie wyróżniono trzy typy fosfolipaz: A, C i D, (PLA, PLC, PLD) [8].

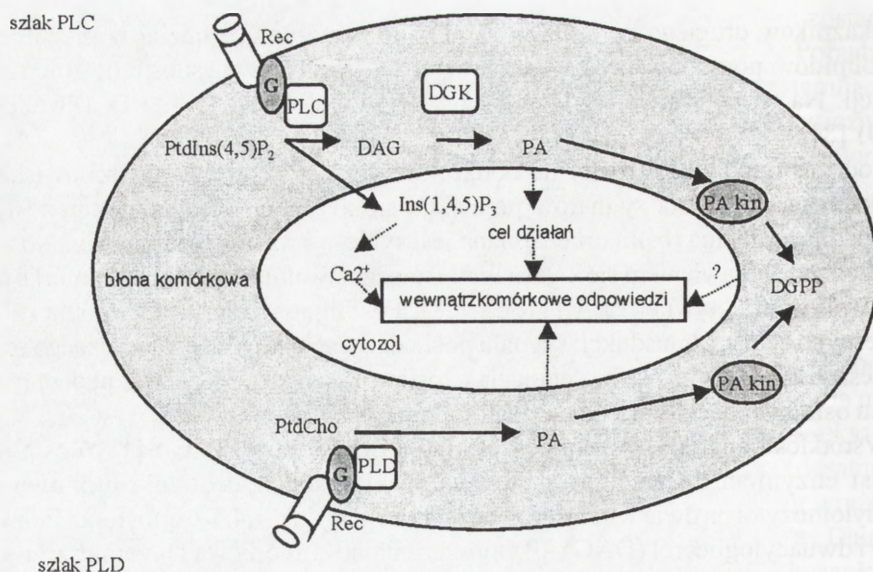
Podczas odpowiedzi roślin na bodźce stresowe pochodzące ze środowiska, na szlakach przenoszenia sygnałów pojawiają się aktywne formy fosfolipaz [8]. W przypadku zranienia roślin uruchamiana jest synteza kwasu jasmonowego, która jest poprzedzona pojawieniem się kwasu linolenowego uwalnianego z błon komórkowych pod wpływem aktywnej PLA [11, 12, 28]. Fosfolipazy odgrywają istotną rolę na wczesnych etapach transdukcji sygnału pochodzącego od stresu osmotycznego oraz w procesach związanych z osmoregulacją u roślin. W transdukcji sygnału pod wpływem stresu osmotycznego biorą udział fosfolipazy C i D [16, 60, 74].

Wśród fosfolipaz C wyróżnia się izoformy: PLC- $\beta$ , PLC- $\gamma$  i PLC- $\delta$  [18]. Fosfolipaza C jest enzymem związanym z błoną. Po aktywacji hydrolizuje błonowy fosfatydyloinozytol na dwie wtórne cząsteczki informacyjne, 1,4,5-trójfosforan inozytolu ( $IP_3$ ) i dwuacyloglicerol (DAG).  $IP_3$  opuszcza błonę komórkową i przemieszcza się w cytoplazmie. Po dotarciu do retikulum endoplazmatycznego, wiąże się z zawartymi w jego błonie kanałami  $Ca^{2+}$  i wpływa na ich otwarcie [59]. W cytoplazmie zwiększa się stężenie jonów  $Ca^{2+}$ . Diacyloglicerol pozostaje w błonie komórkowej i wraz z  $Ca^{2+}$  współdziała w aktywacji kinazy białkowej C PKC (ang. *Protein Kinase C*), [62]. Szlak fosfatydyloinozytolowy prowadzi do powstania w roślinie wielu cząsteczek pełniących rolę sygnalizacyjną.

Fosfolipaza D aktywowana jest przez białko G współpracujące z receptorami błonowymi [58]. Jej aktywacja może następować w odpowiedzi na takie stresy, jak: uszkodzenia mechaniczne, uszkodzenia spowodowane przez mróz oraz promieniowanie typu  $\gamma$  [55, 66, 85]. Ponadto, PLD do swojej aktywności potrzebuje odpowiedniego stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w cytozolu i w przeciwieństwie do PLC produktem jej aktywności jest kwas fosfatydowy PA (ang. *Phosphatidic Acid*), który powstaje w wyniku hydrolizy fosfolipidów błonowych fosfatydylocholina lub fosfatydyloetanolaminy [55]. Powstający w wyniku aktywności PLC DAG może ulegać fosforylacji do kwasu fosfatydowego przez kinazę DAG [84].

**2.2.2.1. Kwas fosfatydowy.** Kwas fosfatydowy jest przełącznikiem drugiego rzędu uruchamianym na dwa sposoby, jeden z udziałem PLC, drugi – PLD. Jest wysoce prawdopodobne, że szlaki te są uruchamiane przez różnego rodzaju bodźce, mogą zachodzić w różnych miejscach w komórce i mogą też w nich brać udział różnego rodzaju prekursorzy PA. Są nimi fosfatydylocholina lub fosfatydyloetanolamina powstałe w wyniku działania PLD lub powstałe na szlaku PLC DAG (ryc. 1) [55].

Różne formy stresów osmotycznych wpływają na wzrost stężenia PA w komórce. Jak wykazano, zwiększony poziom NaCl oraz susza wpływają na powstawanie PA najczęściej na szlaku PLC-kinaza DAG [56]. W przypadku uszkodzenia tkanki roślinnej efektorowym enzymem jest PLD. Powstały PA może również aktywować WIPK (ang. *Wound Induced Protein Kinases*), które są zaliczane do kaskady kinaz MAP [38].



RYCINA 1. Model przedstawiający działanie kwasu fosfatydowego (PA) w komórce. PA jest produkowany w komórce poprzez aktywację dwóch różnych szlaków, jednego z udziałem PLC, drugiego z PLD. PLC hydrolizuje fosfatydyloinozytolo 4,5-dwufosforan ( $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ ) do 1,4,5, trifosforanu inozytoli  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  i diacyloglicerolu (DAG).  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  dyfunduje w cytozolu, gdzie uwalnia jony wapnia. DAG pozostaje w błonie komórkowej, gdzie jest fosforylowany przez kinazę DAG do PA. PLD natomiast wpływa na powstanie PA poprzez hydrolizę lipidów strukturalnych, takich jak: fosfatydylocholina ( $\text{PtdCho}$ ). Zwiększony poziom PA wpływa na szereg procesów poprzez interakcje z takimi białkami, jak: szlak MAPK, CDPK, kanały potasowe. PA jest fosforylowany do DGPP poprzez kinazę PA. DGPP jest niewielkim lipidem i może być sam w sobie cząsteczką sygnałową (zaznaczone jako '?'). Znaczenie pozostałych skrótów użytych w schemacie: kinaza DAG (DGK); kinaza PA (PAkin) [wg 57, zmodyfikowane].

Komórki roślinne wykształciły specyficzny mechanizm obniżania stężenia PA w komórce w wyniku fosforylacji PA do DGPP (*ang. DiacylGlycerol PyroPhosphate*) [57]. Wzrost stężenia tego fosfolipidu inicjują różne bodźce, w tym także te zaliczane do stresów dehydratacyjnych, takich jak: susza, wysokie stężenie NaCl i in. [15, 46]. Ponadto cząsteczka DGPP może sama w sobie stanowić element sygnałowy w transdukcji sygnałów (ryc. 1) [57, 59].

### 2.2.3. Jony wapnia

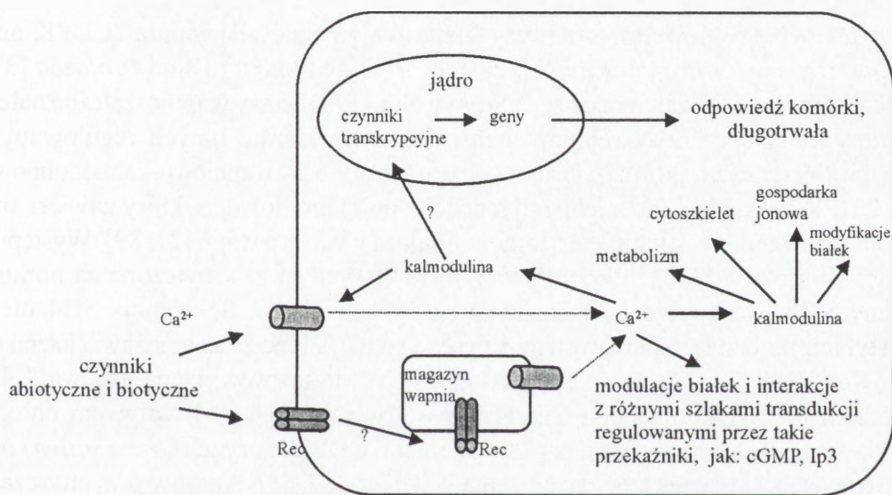
Wapń jest wtórnym informatorem wewnątrzkomórkowym. Działa w połączeniu z różnymi białkami, prowadząc do zmian ich aktywności. Jony wapnia odgrywają szczególną rolę w odpowiedzi roślin na bodźce zewnętrzne należące do stresów biotycznych (wirusy, grzyby) i abiotycznych (światło, chłód, susza, wysoka temperatura, hipoksja). Jako przekaźnik,  $\text{Ca}^{2+}$  wywołuje zmiany w komórce roślinnej wpływając na jej wzrost, rozwój i fizjologię, w wyniku których roślina może dostosować swój rozwój do zmieniających się warunków środowiska (ryc. 2) [77].



Stężenie wolnych jonów wapnia w komórce jest niskie i wynosi przeciętnie  $10^{-4}$  mM, natomiast stężenie zewnątrzkomórkowe wynosi 1–2 mM [1]. Poziom jonów wapnia wewnątrz komórki jest ściśle kontrolowany poprzez wymienniki jonowe obecne w błonie komórkowej i tonoplaście. W warunkach normalnych utrzymuje się wysoki gradient  $Ca^{2+}$  w poprzek błon. W przypadku przejściowego otwarcia kanału  $Ca^{2+}$  w jednej z błon przez sygnał, jony  $Ca^{2+}$  szybko wpływają do cytozolu zgodnie z gradientem elektrochemicznym i uruchamiają zmiany w cytozolowych białkach wrażliwych na  $Ca^{2+}$  [79].

$Ca^{2+}$  wpływa aktywująco na białka określane często sensorami wapniowymi. Zalicza się do nich kalmodulinę CaM, wapniowo-zależne kinazy białkowe CDPKs (ang. *Calcium Dependent Protein Kinases*) oraz kalcyneuryno-podobne białka wiążące wapń [73, 77, 92].

2.2.3.1. *Kalmodulina (CaM)*. Kalmodulina należy do rodziny białek o motywie dłoni EF. Jej cząsteczka składa się z dwóch podobnych, globularnych płatów połączonych długą helisą  $\alpha$ . Każdy płatek zawiera dwa motywy dłoni EF, a każdy motyw wiąże jeden atom wapnia. Kompleks kalmodulina- $Ca^{2+}$  stymuluje szeroki wachlarz



RYCINA 2. Transdukcja sygnałów z udziałem białek wiążących wapń. Bodźce pochodzące ze stresów biotycznych i abiotycznych odbierane są przez komórki wpływają na zmiany stężenia jonów  $Ca^{2+}$  w cytozolu i/lub w innych przedziałach komórkowych (np. w jądrze). Zwiększenie stężenia wolnych jonów  $Ca^{2+}$  napływających spoza komórki czy też z siateczki śródplazmatycznej działa na białka  $Ca^{2+}$ -zależne jak kalmodulina oraz białka kalmodulino-podobne. Aktywacja tych białek umożliwia im wchodzenie w interakcję z wieloma komórkowymi cząsteczkami sygnałnymi i docelowymi wpływając na zmiany w metabolizmie, modyfikacjach białek i cytoszkielecie. Kalmodulina i jony  $Ca^{2+}$  mogą regulować ekspresję genów poprzez uruchamianie określonych kaskad sygnalizacyjnych lub aktywację określonych czynników transkrypcyjnych. Linie przerywane oznaczają napływ jonów  $Ca^{2+}$  z otoczenia lub organelli komórkowych. Znaki zapytania oznaczają nieznane dotychczas cząsteczki biorące udział w transdukcji [wg 77, zmodyfikowane]

enzymów-pomp oraz innych białek. Taki kompleks może wywierać wpływ bezpośredni aktywując enzymy lub pośredni poprzez aktywację zależnych od kompleksu kinaz białkowych, które fosforylując specyficzne białka przeprowadzają je w formę aktywną [79, 92]. Zaktywowana kalmodulina reguluje działanie zależnej od niej kinazy CaM II, pomp  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-azowych znajdujących się w błonie wakuoli, plazmalemy i siateczki śródplazmatycznej oraz czynników transkrypcyjnych i elongacyjnych [79, 80].

Ostatnie badania wykazały, że występują inne białka kalmodulino-podobne, których sekwencja aminokwasowa jest w 40% identyczna z kamoduliną filogenetycznie konserwatywną. Grupa tych białek charakteryzuje się zróżnicowaną ilością motywów EF wiążących wapń (od 3 do 6) [77]. Białka te na końcach C cząsteczek mają miejsca dla prenylacji, co wskazuje, że mogą być zakotwiczone w błonach komórkowych. Dodatni ładunek ich cząsteczek sugeruje subkomórkową lokalizację i prawdopodobieństwo transportu do jądra, co może mieć związek z ich rolą w regulacji transkrypcji [13].

Przykładem białka o budowie podobnej do kalmoduliny jest białko *RD20* (ang. *Responsive Dehydration*), które zidentyfikowano u *Arabidopsis thaliana*. Wzmoczona ekspresja genu kodującego to białko zachodzi pod wpływem suszy, ABA i wysokiego stężenia soli [81].

**2.2.3.2. Kinazy wapniowe.** Kinazy białkowe zależne od wapnia (CDPK ang. *Calcium Dependent Protein Kinases*) zostały wykryte tylko u roślin i *Protozoa* [37]. Domena wiążąca  $\text{Ca}^{2+}$  zawiera cztery motywy dłoni EF. Kinazy wapnio-zależne należą do grupy kinaz serynowo-treoninowych i odróżniają się od innych regulowanych wapniem kinaz, takich jak: kinazy białkowej typu C czy kinazy wapniowo-kalmodulinowej [68]. CDPK są zbudowane z jednego łańcucha polipeptydowego, który zawiera trzy funkcjonalne domeny: katalityczną, autoinhibującą i wiążącą wapń [21, 89]. Występują w cytozolu oraz w błonach komórkowych, w których są zakotwiczone za pomocą domeny SH4 występującej na końcu N cząsteczki białka. Sekwencja SH4 ulega mirystylacji po przyłączeniu kwasu mirystynowego ( $\text{C}_{14}$ ). Proces ten umożliwia interakcję zno-dyfikowanego białka z receptorem błonowym lub dwuwarstwową błoną lipidową [2, 45].

Poziom mRNA kodującego CDPK wzrasta w roślinach pod wpływem chłodu. Przykładem może być wzmoczona ekspresja genu CDPK7 u ryżu (*Oryza sativa*) pod wpływem chłodu i zwiększonego stężenia NaCl [44, 67, 68]. Autorzy przypuszczają, że kinaza CDPK7 może pełnić rolę regulacyjną w tolerancji ryżu na suszę i chłód. Kinazy CDPK mogą pełnić funkcję regulacyjną w ekspresji genów podczas stresu i w metabolizmie komórkowym. Z drugiej strony mogą stanowić źródło cząsteczek sygnałowych w kaskadach sygnalizacyjnych. Ponadto, mogą pełnić rolę w transporcie jonów i wody przez błony oraz wpływać na strukturę i dynamikę cytoszkieletu [44].

Innym przykładem kinaz wapniowych są kinazy asocjujące z sensorami wapnia np. białkiem AtCBL (ang. *Arabidopsis thaliana Calcineurin B-Like Ca<sup>2+</sup> binding protein*), które odgrywają ważną rolę w transdukcji sygnałów pod wpływem chłodu, suszy i zasolenia [37, 73]. AtCBL ma podobną budowę do podjednostki B kalcyneuryny i sensora  $\text{Ca}^{2+}$  występującego w neuronach zwierząt. AtCBL, podobnie jak kalmodulina i kalcyneuryna B, jest małym białkiem przyłączającym wapń. Nie ma jednak funkcji

enzymatycznej [32, 65, 92]. Zwiększony poziom AtCBL1 w komórce obserwuje się pod wpływem chłodu, suszy i zranienia, kiedy to białko CBL1 oddziałuje ze specyficzną kinazą CIPK1 (ang. *CBL-Interacting Protein Kinase 1*). CIPK 1 ma budowę charakterystyczną dla kinaz, tj. przy końcu N- cząsteczki białka znajduje się domena katalityczna zawierająca reszty serynowo-treoninowe, natomiast przy końcu C występuje unikalny region, niezbędny do asocjacji z AtCBL1. Interakcje pomiędzy obiema cząsteczkami białka mają miejsce w przypadku podwyższonego stężenia jonów wapnia [73].

Innym genem związanym z odpornością *Arabidopsis* na stres solny jest gen kodujący białko SOS3 (ang. *SALT OVERLY SENSITIVE 3*), należący do tej samej rodziny genów co AtCBL1. Białka AtCBL i SOS3 pod względem strukturalnym są do siebie podobne. Podobieństwo ich sekwencji aminokwasowej wynosi od 50 do 60% [39, 73]. Mutacje w genach SOS sprawiają, że *Arabidopsis* staje się bardziej wrażliwa na podwyższony poziom jonów Na<sup>+</sup>. W warunkach stresu solnego, podczas którego zwiększa się stężenie wapnia cytozolowego, SOS3 wiąże jony wapnia [24, 39]. Białko SOS3 ma w swej strukturze trzy motywy EF. SOS3 wchodzi w reakcję z białkiem SOS2, które jest kinazą serynowo-treoninową [17, 40]. Powstały kompleks SOS3-SOS2 oddziałuje na białko SOS1, które jest antyporterem dla układu jonów Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>, eksportując jony Na<sup>+</sup> z komórki [72].

Zmiany w stężeniu jonów wapnia w komórce wywołują zmiany konformacyjne sensorów wapniowych. W zależności od rodzaju uaktywnionych sensorów (CaM, CDPK, AtCBL), następuje aktywacja różnych białek docelowych w wyniku interakcji białko-białko. Natomiast powstanie kombinacji złożonej z określonych sensorów i ich substratów zależy od rodzaju sygnału.

#### 2.2.4. Kinaza białkowa C

Poziom kinazy białkowej C PKC (ang. *Protein Kinase C*) jest ściśle związany z ilością DAG w komórce. Ta wielofunkcyjna kinaza białkowa fosforyluje w białkach docelowych reszty seryny i treoniny [1, 70]. Diacyloglicerol zwiększa powinowactwo PKC do Ca<sup>2+</sup>, który uaktywnia PKC już przy fizjologicznym poziomie wapnia w komórce. Do substratów PKC zalicza się białka tworzące układy przenoszenia sygnałów. PKC może fosforylować między innymi białko G i tym samym stymulować kaskadę sygnalizacyjną związaną z cykłąz adenylanową. Ponadto PKC może oddziaływać na proces translacji poprzez fosforylację rybosomowego białka S6 [1, 62, 70].

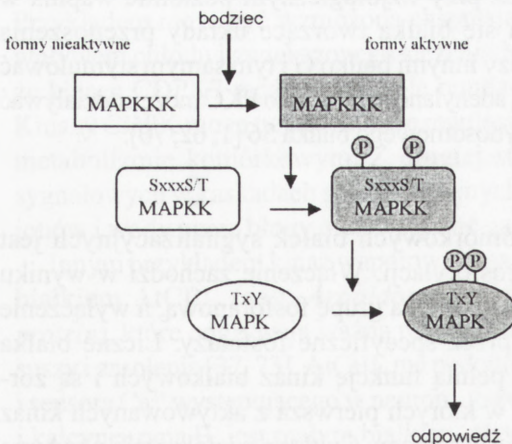
#### 2.2.5. Kaskady kinaz MAP

Aktywność większości wewnątrzkomórkowych białek sygnalizacyjnych jest włączana lub wyłączana w procesach fosforylacji. Włączenie zachodzi w wyniku działania kinazy białkowej, która dodaje do białka grupę fosforanową, a wyłączenie zachodzi poprzez usunięcie tej grupy przez specyficzne fosfatazy. Liczne białka kontrolowane przez fosforylację same pełnią funkcję kinaz białkowych i są zorganizowane w kaskady sygnalizacyjne, w których pierwsza z aktywowanych kinaz fosforyluje następną kinazę znajdującą się w szeregu. Cykl ten wielokrotnie powtarza

się podczas przenoszenia sygnału. Kaskadowe przenoszenie reszty fosforanowej podczas przekazywania sygnału zachodzi przy udziale kinaz MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) [20]. Kinazy MAP przenoszą sygnały do wnętrza komórki od różnych pozakomórkowych bodźców, takich jak: czynniki wzrostowe, hormony, etylen oraz od czynników stresowych środowiska i patogenów. Szlaki transdukcyjne, w których uczestniczą MAPK, biorą udział w licznych procesach związanych z funkcjonowaniem komórek, takich jak: podziały komórkowe, wzrost i różnicowanie komórek oraz w odpowiedzi roślin na stresowe czynniki środowiska. Kinazy MAP odgrywają także kluczową rolę w integrowaniu wielu wewnątrzkomórkowych sygnałów pochodzących od różnych przekazników drugiego rzędu. Integrują także sygnały pochodzące od różnych receptorów [20, 51].

Kinaza MAPKKK fosforyluje kinazę MAPKK, w wyniku przeniesienia grupy fosforanowej na reszty serynowe i serynowo-treoninowe występujące w sekwencji SxxxS/T kinazy MAPKK. Z kolei aktywna MAPKK fosforyluje reszty tyrozynowe i treoninowe występujące w sekwencji TxY kinazy MAPK. Kinaza MAPK jest ostatnim ogniwem w łańcuchu fosforylacji kinaz MAP (ryc. 3). Po ufosforylowaniu może być transportowana do jądra komórkowego i tam uruchamiać ekspresję określonych genów w wyniku uaktywnienia czynników transkrypcyjnych przez fosforylację ich cząsteczek. Z drugiej strony, MAPK kinazy mogą pozostawać w cytoplazmie i fosforylować specyficzne dla nich enzymy, takie jak: kinazy białkowe, lipazy lub elementy cytoszkieletu [20].

**2.2.5.1. Udział kinaz MAP w transdukcji sygnałów pochodzących od stresów abiotycznych.** Kinazy MAPK u *Arabidopsis thaliana* są kodowane przez rodzinę genów liczącą co najmniej dziewięć grup (ATMPK1-9). Na podstawie analizy ich sekwencji aminokwasowej mogą być sklasyfikowane w czterech mniejszych podgrupach [48]. Wśród zidentyfikowanych kinaz MAP są homologi kinazy MAPK, np. ATMPK1, ATMPK2 [48]; kinaz MAPKK, np. AtMEK, NPK2, ATMKK2-4 [50] oraz MAPKKK, takie jak: NPK1, ATMEK1-4, CTR1 [49, 50]. Pomimo że zidentyfikowano wiele komponentów kaskad kinazowych, dane o interakcjach pomiędzy kinazami MAPK i MAPKK oraz MAPKK z MAPKKK nie zostały jeszcze do końca



RYCINA 3. Regulacja kaskady MAP kinaz przez fosforylację. Nieaktywna, zdefosforylowana MAPK aktywowana jest przez fosforylację reszty treoninowej i tyrozynowej, sekwencja TxY, przeprowadzanej przez MAPKK. Kinaza MAPK (MAPKK) aktywowana jest przez przyłączenie grup fosforanowych do reszt serynowej i serynowo-treoninowej, sekwencja SxxxS/T. Reakcja ta katalizowana jest przez kinazę MAPKKK (MAPKKK) [wg 20, zmodyfikowane]

ustalone [28]. Poznano jedynie interakcje pomiędzy AtMEK (MAPKK) a ATPMK4 (MAPK), które wskazały na kinazę AtMEK jako aktywatora ATPMK4. Ponadto wykazano, iż u drożdży homolog kinazy MAPKKK-ATMEKK1 nie tylko wchodzi w interakcje, ale również działa aktywująco na kinazę AtMEK. Dane te sugerują, iż kinazy: ATMEKK1, ATMEK i ATPMK4 stanowią kaskadę MAPK kinaz w komórkach *Arabidopsis* [22, 50, 51].

Niska temperatura, stres solny i dotyk wpływają na zwiększenie poziomu transkryptów kodujących kinazy ATMEKK1, ATPMK3 i ATPK19 u *Arabidopsis thaliana*. Jak wykazano, kinaza ATMEKK1 funkcjonuje w kaskadzie kinazowej jako MAPKKK, natomiast ATPMK3 jest homologiem MAPK, a ATPK19 kinazy S6. Akumulacja mRNA tych kinaz zachodzi jednocześnie pod wpływem wyżej wymienionych czynników [49, 51].

U *Medicago sativa* zidentyfikowano kinazę p44<sup>MMk4</sup> indukowaną przez chłód i suszę. Dalsze badania nad kinazą p44<sup>MMk4</sup> wykazały, że jej zawartość w komórce nie ulegała zmianie pod wpływem czynników stresowych, ujawniając tym samym, że inne potranslacyjne mechanizmy aktywują jej działanie. Jakkolwiek ekstremalne temperatury, susza, stres solny są zaliczane do różnych form stresu osmotycznego, to wysoka temperatura oraz wysokie stężenie jonów sodu nie aktywują kinazy p44<sup>MMk4</sup>, co wskazuje na występowanie odrębnych szlaków uruchamianych przez różne stresy przy udziale kinazy p44<sup>MMk4</sup> [26].

W przypadku stresu solnego uruchamiana jest kinaza SIMK (ang. *Salt Stress-Induced MAPK*) aktywowana specyficznie przez SIMKK. Jak wykazano, kinaza SIMKK współdziała tylko z kinazą SIMK. Kinazy SIMK i SIMKK są związane ze szlakiem sygnałów uruchamianym przez stres solny, który jest bezpośrednim aktywatorem kinazy SIMKK [31, 60].

W komórkach tytoniu stres osmotyczny (250 mM NaCl lub 900 mM sorbitol) wywołuje szybką aktywację dwóch kinaz białkowych: kinazy SIPK (ang. *Salicylic acid-Induced Protein Kinase*) oraz homologa kinazy ASK1 (ang. *Arabidopsis Serine/threonine Kinase 1*). Obie kinazy uczestniczą w odpowiedzi komórki roślinnej na stres, pojawiają się w kilka minut po zadziałaniu czynnika stresowego. Szybka aktywacja tych białek może sugerować udział dwóch różnych, równoległych szlaków sygnalizacyjnych z udziałem kinazy SIPK oraz homologa kinazy ASK1 [47].

Kolejnym przykładem kinazy MAP jest kinaza uruchamiana przez cząsteczkę sygnałowa, jaką jest H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, który może pojawiać się w komórce pod wpływem różnych czynników stresowych. Kinazą aktywowaną przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jest ANP1 (ang. *Arabidopsis NPK-1 like Protein kinase; NPK-1, Nicotiana Protein Kinase*). ANP1 inicjuje kaskadę fosforylacyjną złożoną z dwóch kinaz, ATPMK3 oraz ATPMK6 [40]. Szlak transdukcji, uruchamiany przez ANP1, prowadzi do indukcji syntezy, m.in. glutationo-S-transferazy, białek szoku termicznego – HSP (ang. *Heat Shock Proteins*), które uczestniczą w detoksyfikacji i stabilizacji zniszczonych białek, pomagając tym samym komórce roślinnej w odpowiedzi na całą gamę stresów [36, 42, 43, 71].

## 2.2.6. Fosfatazy

Fosforylacja i defosforylacja białek reguluje wiele procesów biologicznych, w których uczestniczą kinazy i fosfatazy [5, 23]. Kinazy i fosfatazy białkowe zostały podzielone na dwie główne grupy ze względu na specyficzność substratów: grupę serynowo-treoninowych kinaz i serynowo-treoninowych fosfataz oraz tyrozynowych kinaz i tyrozynowych fosfataz [25, 63].

Serynowo-treoninowe fosfatazy, PPazy (ang. *Protein Phosphatase*) specyficznie katalizują defosforylacje reszt fosfoserynowych i fosfotreoninowych w swoich substratach, którymi są kinazy serynowo-treoninowe. Fosfatazy tej grupy zostały podzielone na cztery podgrupy: PP1, PP2A, PP2B, PP2C [10].

Tyrozynowe fosfatazy, PTPazy (ang. *Protein Tyrosine Phosphatases*), defosforylują resztę fosfotyrozynową kinaz tyrozynowych. Wśród PTPaz wyróżniono trzy podgrupy w zależności od miejsca ich występowania: PTPazy receptorowe, wewnątrzkomórkowe i PTPazy występujące w obu przedziałach komórkowych [63, 78]. Typową cechą strukturalną PPazy receptorowej jest obecność w strukturze jej cząsteczki domeny zewnątrzkomórkowej, pojedynczego regionu transbłonowego i jednej lub dwóch katalitycznych domen zlokalizowanych w cytozolu. Wewnątrzkomórkowa PTPaza zawiera jedną domenę katalityczną oraz różne zakończenia N- i C-terminalne, które prawdopodobnie pełnią funkcję regulatorową [78].

MAPK kinazy, które aktywowane są przez różnego rodzaju stresi, mogą być inaktywowane przez PPazy i PTPazy. MAP kinaza HOG1 z drożdży występująca w szlaku transdukcijnym wywołanym stresem solnym jest inaktywowana przez fosfatazę PTP [86, 87]. Ekspresja genu kodującego fosfatazę tyrozynową AtPTP1 u *Arabidopsis* jest zwiększona pod wpływem stresu solnego, natomiast pod wpływem niskiej temperatury następuje szybki spadek poziomu jego transkryptu [53].

Fosfataza 2A (PP2A), tak jak AtPTP1 jest również inaktywowana pod wpływem chłodu [58]. Niska temperatura m.in. wywołuje intensywny napływ jonów  $Ca^{2+}$  do cytozolu i fosforylację elementów transdukcji sygnałów i czynników transkrypcyjnych [9]. Obecność PP2A w cytozolu może zablokować działanie wielu kluczowych kinaz, które należą do szlaku uruchamianego przez podwyższony poziom wapnia w komórce, jednakże obecność tych jonów blokuje jej aktywność fosfatazową [14]. Dezaktywacja PP2A umożliwia uruchomienie szlaku transdukcji indukowanego chłodem [53].

## 2.3. Zjawisko 'cross-talk'

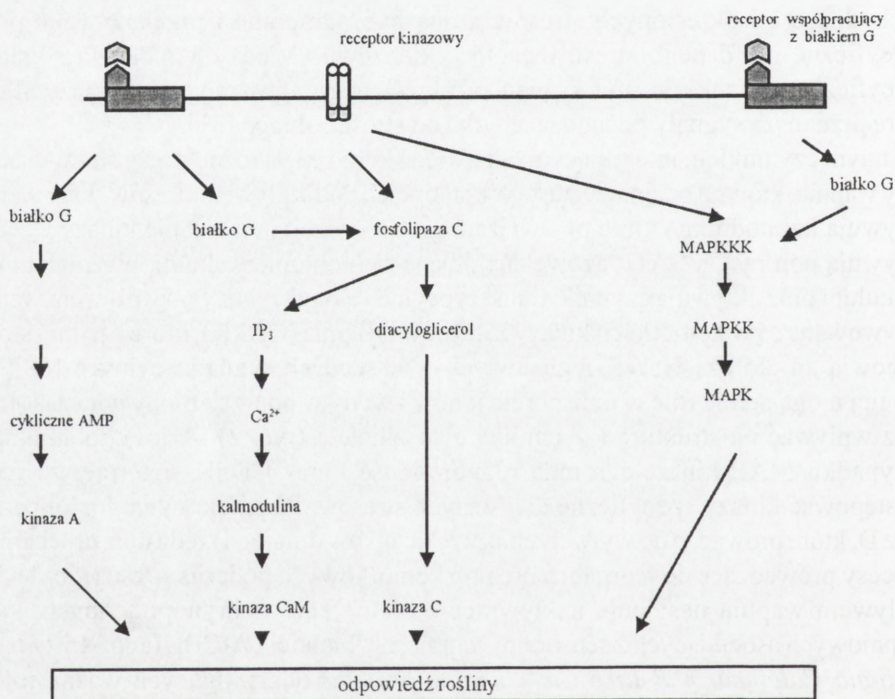
Bodźce pochodzące ze środowiska zewnętrznego są odbierane za pomocą różnych receptorów komórkowych, położonych na zewnętrznej stronie membrany. Odebrane sygnały są przekazywane do wnętrza komórki za pomocą różnych szlaków transdukcyjnych. Końcowym efektem przeniesienia sygnału jest uruchomienie ekspresji określonych genów, w wyniku której następują zmiany w stanie fizjologicznym komórek, dostosowanie metabolizmu komórkowego do warunków stresu oraz zabezpieczenie struktur komórkowych, membran i ściany komórkowej przed szkodliwym wpływem czynnika stresowego [29, 91]. W warunkach naturalnych roślina może odbierać całą

kombinację różnych sygnałów i wobec nich musi skierować zintegrowaną odpowiedź [33, 88]. Często odpowiedź rośliny na działanie jednego czynnika stresowego może powodować zwiększenie tolerancji na inne czynniki stresowe lub odwrotnie, odpowiedź na jeden czynnik stresowy może blokować odpowiedź rośliny na inny czynnik. W związku z tym, reakcja rośliny na różne bodźce stanowi zintegrowany system wzajemnie nakładających się i powiązanych z sobą procesów, które zachodzą w komórkach po odebraniu sygnałów i ich przekazaniu do komórek. Większość stresów abiotycznych, takich jak: susza, chłód i zasolenie, powoduje dehydratację komórek [6, 29, 75, 91]. Sygnały pochodzące od tych stresów mogą być odbierane w postaci zmian osmotycznych zachodzących w ścianach komórkowych [29]. Jak wspomniano wyżej, osmosensorowe receptory kinazowe oraz kinazy MAPK zostały zidentyfikowane u wielu roślin poddanych stresom abiotycznym [20, 51]. Wynika stąd, że odbieranie bodźców pochodzących od stresów abiotycznych, a następnie ich przekazywanie do komórek zachodzi przy udziale receptorów kinazowych i MAPK kinaz. System MAP kinaz jest prawdopodobnie głównym systemem, który integruje procesy zachodzące w odpowiedzi roślin na różnego rodzaju stresy. Ze względu na dużą różnorodność zidentyfikowanych genów kodujących receptory kinazowe oraz kinazy typu MAPK [3, 20, 83, 90], sygnały pochodzące od określonych stresów mogą być odbierane i przekazywane przez specyficzne dla danego stresu receptory kinazowe i kinazy MAPK. Przykładem specyficznego przekazywania sygnału od określonego stresu mogą być kinazy SIMK, które przenoszą sygnały pochodzące tylko od stresu solnego [31].

Innym czynnikiem integrującym odpowiedź komórki na różne stresy środowiska są jony wapnia, których poziom wzrasta w komórkach pod wpływem stresów. Jony wapnia aktywują kalmoduliny, które po związaniu z  $Ca^{2+}$  regulują działanie kinazy CaM II, aktywują pompy  $Ca^{2+}$ -ATP-azowe znajdujące się w błonie wakuoli, plazmalemy i retikulum oraz aktywują czynniki transkrypcyjne i elongacyjne. Pod wpływem wapnia aktywowane są w komórkach kinazy zależne od wapnia (CDPK), które z jednej strony stanowią źródło cząsteczek sygnałowych w kaskadach sygnalizacyjnych [68], a z drugiej mogą pełnić rolę w transporcie jonów i wody w poprzek błony podczas stresu oraz wpływać na strukturę i dynamikę cytoszkieletu (ryc. 2) [44]. Podobnie jak w przypadku MAP kinaz, ogromna różnorodność kinaz CDPK sugeruje, że mogą występować kinazy specyficzne dla różnych stresów. Wapń aktywuje fosfolipazę C oraz D, które prowadzą do wytworzenia przekaźników drugiego rzędu oraz uruchamiają procesy prowadzące do reorganizacji błon komórkowych podczas stresu (ryc. 1). Pod wpływem wapnia następuje uaktywnienie białek kalcyneurynopodobnych, kinaz wapniowych asocjujących z sensorami wapnia, np. białkiem AtCBL (ang. *Arabidopsis thaliana Calcineurin B-Like Ca<sup>2+</sup> binding protein*) odgrywających ważną rolę w transdukcji sygnałów pod wpływem chłodu, suszy i zranienia [73], wpływając na uruchomienie ekspresji wielu genów [52]. Zwiększone stężenie wapnia w komórce inhibuje fosfatazę PP2A, która jest inhibitorem szlaku MAP kinazowego w warunkach niestresowych [9, 53].

Zjawisko 'cross-talk' wskazuje, iż szlaki transdukcji nie istnieją od siebie niezależnie, lecz tworzą charakterystyczną sieć współzależności. Przykładem na to może być aktywacja białka G, odbywająca się za pomocą albo receptora właśnie z nim współpracującego, albo receptora kinazowego. Aktywna cząsteczka tego białka nie tylko uczestniczy w aktywacji szlaku, który uruchamia szlak fosfolipazowy, ale również aktywuje kaskady kinaz MAP (ryc. 4) [33, 64, 88].

Obecny stan wiedzy na temat transdukcji sygnałów w komórce roślinnej pod wpływem stresów nie daje jeszcze pełnego obrazu procesów zachodzących w roślinie. Trudno jest przedstawić całościowy szlak prowadzący od receptora poprzez wszystkie elementy transdukcji, wywołany określonym bodźcem. Złożenie wszystkich znanych nam elementów kaskad sygnalizacyjnych w jedną całość nie jest rzeczą łatwą, choćby dlatego, że każda cząsteczka biorąca udział w transdukcji, z reguły badana była pod kątem działania jednego określonego bodźca. Należy zwrócić uwagę, iż rośliny poddawane są w warunkach naturalnych działaniu czynników, na które z równą precyzją reagują specyficzną odpowiedzią. Ponadto znając współzależności pomiędzy szlakami transdukcijnymi określanymi mianem 'cross-talk', należy zdać sobie sprawę zarówno



RYCINA 4. Schemat przedstawiający wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne związane z białkiem G. Przedstawiony został szlak prowadzący od receptorów współpracujących z białkiem G poprzez cAMP i PLC, a także od receptorów katalitycznych poprzez PLC i kaskadę kinaz MAP [wg 79, zmodyfikowane]



ze złożoności całego układu, jak i jego skuteczności wynikającej z reakcji obronnych roślin.

*Autorka pracy dziękuje Tadeuszowi Roratowi za dyskusję i pomoc w redagowaniu niniejszej pracy.*

## LITERATURA

- [1] ALBERTS B, BRAY D, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. Podstawy biologii komórki. PWN, Warszawa 1999: 372-394, 450-464.
- [2] BARKER LDP, TEMPLETON MD, FERGUSON IB. A 67 kDa plasma membrane-bound  $Ca^{2+}$  - stimulated protein kinase active in sink tissue of higher plants. *Planta* 1998; **205**: 197-204.
- [3] BECRAFT PW. Receptor kinases in plant development. *Trends in Plant Sci* 1998; **10**: 384-388.
- [4] BECRAFT PW, STINARD PS, MCCARTY DR. CRINKLY4: a TNFR-like receptor kinase involved in maize epidermal differentiation. *Science* 1996; **273**: 1406-1409.
- [5] BOYER PD, KREBS EG. The enzymes. 1996; Vol. 17 (*N.Y. Academic Press*).
- [6] BRAY EA. Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Sci* 1997; **2**: 48-54.
- [7] CHANG C, MEYEROWITZ EM. The ethylene hormone response in *Arabidopsis*: A eukaryotic two-component signalling system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; **92**: 4129-4133.
- [8] CHAPMAN KD. Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends in Plant Sci* 1998; **3**: 419-426.
- [9] CHEN J, MARTIN BL, BRANTIGAN DL. Regulation of protein ser-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science* 1992; **257**: 1261-1264.
- [10] COHEN P. Structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 453-508.
- [11] CONCONI A. et al. Intracellular levels of free linolenic and linoleic acids increase in tomato leaves in response to wounding. *Plant Physiol* 1996; **111**: 797-803.
- [12] CREELMAN RA, MULLET JE. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997; **48**: 355-381.
- [13] DEISSEROTH K, HEIST EK, TSIEN RW. Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature* 1998; **392**: 7913-7924.
- [14] DESPRES SC, SUBRAMANIAM R, MATTON DP, BRISSON N. The activation of the potato PR-10a gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *Plant Cell* 1995; **7**: 589-598.
- [15] FRANK W, et al. A role of phospholipase D during early events of dehydration: water-deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 2000; **12**: 111-124.
- [16] FRANK W, MUNNIK T, KERKMANN K, SALAMINI S, BARTELS D. Water-deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 2000; **12**: 111-123.
- [17] HALFER U. et al. The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3735-3740.
- [18] HATRWECK LM, LLEWELLYN DJ, DENNIS ES. The *Arabidopsis thaliana* genome has multiple divergent forms of phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Gene* 1997; **202**: 151-156.
- [19] HERVE C. et al. Characterization of an *Arabidopsis thaliana* gene that defines a new class of putative plant receptor kinases with an extracellular lectin-like domain. *J Mol Biol* 1996; **258**: 778-788.
- [20] HIRT H. Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 11-15.
- [21] HUANG JF. et al. Activation of  $Ca^{2+}$ -dependent protein kinase involves intramolecular binding of a calmodulin-like regulatory domain. *Biochemistry* 1996; **35**: 13222-13230.
- [22] HUANG Y, GUPTA R. et al. ATMPK4 an *Arabidopsis* homolog of mitogen-activated protein kinase is activated *in vitro* by ATMEK1 through threonine phosphorylation. *Plant Physiol* 2000; **122**: 1301-1310.
- [23] HUNTER T. Protein kinases and phosphatases the ying and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 1995; **80**: 225-236.

- [24] ISHITANI M. et al. SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* 2000; **12**: 1667-1677.
- [25] JOHNSON NL, NOBLE MEM, OWEN DJ. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 1996; **85**: 149-153.
- [26] JONAK C. et al. Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; **93**: 11274-11279.
- [27] JÓZEFOWSKI S. Detekcja i transdukcja sygnału w reakcjach odpornościowych roślin. I. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 609-621.
- [28] JÓZEFOWSKI S. Detekcja i transdukcja sygnału w reakcjach odpornościowych roślin. II. *Post Biol Kom* 2000; **27**: 623-631.
- [29] KACPERSKA A. In: Cold-Adapted Organisms. Ecology, physiology, enzymology and molecular biology (Margesin R. & Scinner F., eds), *Springer*. 1999: 79-103.
- [30] KAWIAK J, MIRECKA J, OLSZEWSKA M, WARCHOŁ J. Podstawy cytofizjologii. PWN, Warszawa 1997: 448-587.
- [31] KIEGERL S, CARDINALE F, SILIGAN CH. et al. SIMKK, a mitogen-activated protein kinase kinase is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant Cell* 2000; **12**: 2247-2258
- [32] KLEE CB, REN H, WANG X. Regulation of calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* 1998; **273**: 13367-13370.
- [33] KNIGHT HM, KNIGHT MR. Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Sci* 2001; **6**: 262-267.
- [34] KOBE B, DEISENHOFER J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* 1994; **19**: 415-421.
- [35] KOPCEWICZ J, LEWAK S. Podstawy fizjologii roślin. PWN, Warszawa 1998; 106-134, 575-633.
- [36] KOVTUN Y, CHIU W-I, TENA G, SCHEEN J. Functional analysis of oxidative-stress-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **6**: 2940-2945.
- [37] KUDLA J, XU Q, GRUISSSEN W, LUAN S. Genes encoding calcineurin B-like protein in *Arabidopsis* are differentially regulated by stress signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4718-4723.
- [38] LEE S. et al. Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*. *Plant J* 2001; **5**: 479-486.
- [39] LIU J, ZHU JK. A calcineurin sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 1998; **280**: 1943-1945.
- [40] LIU J. et al. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3730-3734.
- [41] MAEDA T, WURLER-MURPHY SM, SAITO H. A two-component system that regulates an osmo-sensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 1994; **369**: 242-245.
- [42] MARIMOTO RI, SANTORO G. Stress-inducible responses and heat shock protein: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat Biotechnol* 1998; **16**: 833-838.
- [43] MARRS KA. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1996; **47**: 127-158.
- [44] MARTIN MI, BUSCONI L. A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1442-1449.
- [45] MARTIN ML, BUSCONI L. Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *Plant J* 2000; **24**: 1-7.
- [46] MEIJER HJG. et al. Hyperosmotic stress rapidly generates lyso-phosphatidic acid in *Chlamydomonas*. *Plant J* 2001; **25**: 541-548.
- [47] MIKOŁAJCZYK M, AWOTUNDE OS, MUSZYŃSKA G, KLESSIG DF, DOBROWOLSKA G. Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* 2000; **12**: 165-178.
- [48] MIZOGUCHI T. et al. Characterization of two cDNA that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J* 1994; **5**: 111-122.
- [49] MIZOGUCHI T. et al. A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 765-769.

- [50] MIZOGUCHI T, ICHIMURA K, MORRIS P, GIRAUDAT J, MATSUMOTO K, SCHINOZAKI K. Identification of a possible MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants. *FEBS Lett* 1998; **437**: 56-60.
- [51] MIZOGUCHI T, ICHIMURA K, SCHINOZAKI K. Environmental stress response in plants: The role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotechnol* 1997; **15**: 15-19.
- [52] MONROY AF, DHINDSA RS. Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium. *Plant Cell* 1995; **7**: 321-331.
- [53] MONROY AF, SANGWAN V, DHINDSA SD. Low-temperature signal transduction during cold acclimation-protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation. *Plant Cell* 1998; **13**: 653-660.
- [54] MU JH, LEE HS, KAO TH. Characterization of a pollen-expressed receptor-like kinase gene of *Petunia inflata* and the activity of its encoded kinase. *Plant Cell* 1994; **6**: 709-721.
- [55] MUNNIK T. et al. Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J* 2000; **22**: 147-154.
- [56] MUNNIK T. et al. Identification of diacylglycerol pyrophosphate as a novel metabolic product of phosphatidic acid during G-protein activation in plants. *J Biol Chem* 1996; **271**: 15708-15715.
- [57] MUNNIK T. Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends in Plant Sci* 2001; **6**: 227-233.
- [58] MUNNIK T, ARISZ SA, DE VRIJE T, MUSGRAVE A. G protein activation stimulates phospholipase D signaling in plants. *Plant Cell* 1995; **7**: 2197-2210.
- [59] MUNNIK T, IRVINE RF, MUSGRAVE A. Phospholipid signalling in plants. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1389**: 222-272.
- [60] MUNNIK T, LIGTERINK W, MESKIENE I, CALDERINI O, BEYERLY J, MUSGRAVE A, HIRT H. Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyperosmotic stress. *Plant J* 1999; **20**: 381-388.
- [61] MURATA N, LOS DA. Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiol* 1997; **115**: 875-879.
- [62] MURRAY NR, THOMPSON LJ, FIELDS AP. The role of protein kinase C in cellular proliferation and cell cycle control. in: P.J. Parker, L.V. Dekker (Eds.) *Protein kinase C. R.G. Landes USA*. 1997; 97-120.
- [63] NEEL BG, TONKS NK. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 1997; **9**: 193-204.
- [64] NEER EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signal pathways. *Cell* 1995; **73**: 937-952.
- [65] OLAFSSON P, WANG T, LU B. Molecular cloning and functional characterization of the *Xenopus* Ca<sup>2+</sup>-binding protein frequenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 8001-8005.
- [66] RYU SB, WANG X. Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves. *Biochim Biophys Acta* 1996; **1303**: 243-250.
- [67] SAIJO J, HATA S, KYOZUKA J, SHIMAMOTO K, IZUI K. Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J* 2000; **23**: 319-327.
- [68] SAIJO Y, HATO S, IZUI K. Characterization of a rice cold-stress-inducible calcium dependent protein kinase 475 (H1p18). *Plant Cell Physiol* 1998; **39**: 127-131.
- [69] SCHANKLIN J, CAHOON EB. Desaturation and modifications of fatty acids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998; **49**: 611-641.
- [70] SCHENK PW, SNAAR-JAGALSKA A. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Molecular Plant Cell* 1999; **1449**: 1-24.
- [71] SCHÖFFL F, PRAND LR, REIND I. Regulation of the heat shock response. *Plant Physiol* 1998; **117**: 1135-1141.
- [72] SHI H. et al. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 6896-6901.
- [73] SHI J, KIM K-N, RITZ O, ALBRECHT V, GUPTA R, HARTER K, LUAN S, KUDLA J. Novel protein kinase associated with calcineurin B-like calcium sensors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1999; **11**: 2393-2406.
- [74] SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol* 1997; **115**: 327-334.
- [75] SKRIVER K, MUNDY J. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 1990;

- 2: 503-512.
- [76] SMIT MJ, IYENGAR R. Mammalian adenylyl cyclases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1998; **32**: 1-21.
- [77] SNEDDEN WA, FROMM H. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends in Plant Sci* 1998; **8**: 299-304.
- [78] STONE J, WALKER JC. Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol* 1995; **108**: 451-457.
- [79] STRYER L. Biochemia. PWN, Warszawa, IV wyd. 1997: 311-379.
- [80] SZYMANSKI DB, LIAO B, ZIELINSKI RE. Calmodulin isoforms differentially enhance the binding of cauliflower nuclear proteins and recombinant TGA3 to a region derived from the *Arabidopsis* CaM-3 gene promoter. *Plant Cell* 1996; **8**: 1266-1273.
- [81] TAKAHASHI S, KATAGIRI T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. An *Arabidopsis* gene encoding a Ca<sup>2+</sup>-binding protein is induced by abscisic acid during dehydration. *Plant and Cell Physiology* 2000; **41**: 898-903.
- [82] TORII KU. The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* 1996; **8**: 735-746.
- [83] URAO T, YAKUBOV B, YAMAGUCHI-SCHONZAKI K, SEKI M, HIRAYAMA T, SCHINOZAKI K. A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* 1999; **11**: 1743-1754.
- [84] VAN DER LUIT AH. et al. Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol* 2000; **123**: 1507-1515.
- [85] VOISINE R, VEZINA LP, WILLEMOT C. Modification of phospholipid catabolism in microsomal membranes of  $\gamma$ -irradiated cauliflower (*Brassica oleracea* L.). *Plant Physiol* 1993; **102**: 213-218.
- [86] WURGLER-MURPHY SM, MAEDA T, WITTEN EA, SAITO H. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 1289-1297.
- [87] WURGLER-MURPHY SM, SAITO H. Two-component signal transduction and MAPK cascades. *Trends Biochem Sci* 1997; **22**: 172-176.
- [88] XING-WANG D, YOSHIHARU YY. Positive feedback in plant signaling pathways. *Trends in Plant Sci* 1998; **10**: 374-375.
- [89] YOO BC, HARMON AC. Intramolecular binding contributes to the activation of CDPK, a protein kinase with a calmodulin-like domain. *Biochem* 1996; **35**: 12029-12037.
- [90] ZHANG S, KLESSIG DF. The tobacco wounding activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 7225-7230.
- [91] ZHU J-K. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sci* 2001; **2**: 66-71.
- [92] ZIELINSKI RE. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998; **49**: 697-725.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 10.12.2002 r.

Przyjęto: 03.04.2002 r.

Adres autora: 60-479 Poznań, ul. Strzeszyńska 34,

e-mail: [\\_kste@igr.poznan.pl](mailto:_kste@igr.poznan.pl)

## TLENEK AZOTU U ROŚLIN

### NITRIC OXIDE IN PLANTS

Adam MATKOWSKI

Katedra Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Akademia Medyczna we Wrocławiu

*Streszczenie:* Tlenek azotu NO, znany przekaźnik sygnałów komórkowych u ssaków odgrywa nie mniejszą rolę w procesach fizjologicznych roślin. W artykule tym omówiono aktualny stan wiedzy o pochodzeniu, funkcjach i mechanizmach działania NO w organizmach roślinnych. Tlenek azotu jest produkowany w roślinie przez enzymy o aktywności podobnej do ssaczy syntaz tlenu azotu (NOS). Innym, specyficznym dla roślin źródłem NO są reduktazy azotanowe oraz w szczególnych warunkach nieenzymatyczne reakcje oksydoredukcyjne. Reakcje odpornościowe na stres związany z patogenezą, promieniowaniem nadfioletowym czy uszkodzeniem mechanicznym są najlepiej dotąd udokumentowaną rolą NO. Wywiera on także wpływ na związaną ze stresem produkcję metabolitów wtórnych i bierze udział w regulacji przynajmniej niektórych procesów morfogenetycznych. W roślinach wprost istnieje kilka dróg przekazywania sygnału od NO. Uczestniczą w tym cykliczne nukleotydy (cGMP i cADP-ryboza), kwas salicylowy, reaktywne formy tlenu i kinazy białkowe oraz prawdopodobnie inne, niezbadane jeszcze elementy. Przedstawiono również ważniejsze zagadnienia wymagające zbadania w najbliższej przyszłości i przedyskutowano rolę NO jako regulatora wzrostu i rozwoju oraz uniwersalnego mediatora w fizjologii stresu.

*Słowa kluczowe:* tlenek azotu, stres, odporność roślin, wolne rodniki

*Summary:* Nitric oxide, the well-known mammalian cell signalling transducer, plays an important role also in plant physiology. This paper explains the current knowledge of NO production, function and mechanisms of action in plants. Nitric oxide in plants is synthesized by the enzymes of similar activity to the mammalian nitric oxide synthases. Alternatively, it can be produced by nitrate reductases, which are a plant-specific source of NO. Non-enzymatic formation of NO by redox reactions was also observed. Nitric oxide mediates a variety of stress responses to pathogens, UV irradiation, mechanical damage, has been particularly well documented. NO influences the stress related secondary metabolism as well as participates in regulation of some developmental processes. The coexistence of several NO signal transduction pathways has been reported in plants. Elements taking part therein are: cyclic nucleotides (cGMP, cADP-ribose), salicylic acid, reactive oxygen species, protein kinases, and most probably some other compounds, still to be discovered. Some of the most urgent problems to be studied in the next future are also presented. The significance of NO as a non-typical plant growth regulator and universal stress-signalling mediator is discussed.

*Keywords:* nitric oxide, stress, plant immunity, free radicals

*Wykaz stosowanych skrótów:* **NO** – tlenek azotu, **NOS** – syntaza tlenku azotu, **ROS** – reaktywne formy tlenu, **SA** – kwas salicylowy, **NR** – reduktaza azotanowa, **PAL** – amoniakoliza L-fenylalaniny, **ChS** – syntaza chalkonowa, **PR-1** (*patogenesis related*) – białko związane z patogenezą, **cGMP** – cykliczny monofosforan guanozyny, **cADPR** – rybozyd cyklicznego difosforanu adenozyne.

## ROŚLINY, NO I CO Z TEGO... WYNIKA

O roli tlenku azotu (NO) w organizmach i komórkach ssaków, w tym i człowieka, wiadomo już bardzo dużo przy wciąż szybkim postępie badań nad mechanizmami działania tej cząsteczki oraz jej znaczeniem w medycynie. W 1998 roku nagroda Nobla w dziedzinie medycyny została przyznana za odkrycia związane z NO. Nie sposób wymienić choćby niewielkiej części prac dotyczących tego związku – jest ich co najmniej 35 tysięcy (informacja ze strony internetowej poświęconej NO – URL: <http://www.apnet.com/no>). W polskim piśmiennictwie problematyka związana z tlenkiem azotu była także podejmowana, jednak tylko z punktu widzenia fizjologii człowieka [20]. W przypadku roślin, zainteresowanie NO jest znacznie świeższej daty i daleko jeszcze do pełnego obrazu jego roli w fizjologii organizmu roślinnego. Mimo tej dysproporcji, coraz większa ilość ciekawych wyników badań jest dowodem, iż warto podjąć próbę zebrania i usystematyzowania wiedzy o działaniu NO, równocześnie wskazując na pojawiające się w związku z tymi wynikami nowe pytania dotyczące mechanizmów regulujących życie roślin. Tym bardziej że NO wydaje się działać w roślinach nie tylko w sposób dla nich specyficzny, ale także podobnie jak w organizmach zwierzęcych. Analogie takie otwierają zupełnie nowe możliwości poznania mechanizmów działania biologicznie aktywnych substancji pochodzenia roślinnego w medycynie, a równocześnie wyjaśniania ich funkcji w roślinie, które były często dotąd spychane na drugi plan.

Początkowo tlenki azotu przyciągały uwagę biologów roślin, głównie w kontekście zanieczyszczeń atmosfery jako gazy o działaniu toksycznym. Pierwsze doniesienia o funkcjonowaniu endogennego NO w roślinach dotyczyły udziału w interakcji roślin motylkowych z bakteriami *Rhizobium* oraz kaskadowej reakcji na atak patogenów [17,39]. Kolejne badania wskazywały na coraz bardziej wielokierunkowe działanie NO, jednak szczególnie istotny wydaje się obecnie udział tego związku w regulacji szeroko pojętych reakcji na abiotyczne i biotyczne czynniki środowiskowe.

### 1. SKĄD SIĘ BIERZE, NO I JAK?

#### Syntazy tlenku azotu

W komórkach ssaków [20,45] NO jest produkowany przez dobrze poznany enzym – syntazę tlenku azotu (NOS – *nitric oxide synthase* EC 1.14.13.39), występującą w kilku formach. Substratem NOS jest tlen cząsteczkowy i L-arginina, a produktami

katalizowanej przez ten enzym reakcji jest cząsteczka NO i aminokwas L-cytrulina. Enzym ten, o kompleksowej strukturze, wymaga do swego działania kofaktorów: NAD(P)H, jonów wapnia, kalmoduliny, FAD (dinukleotyd flawino-adeninowy), FMN (mononukleotyd flawinowy) i tetrahydro-L-biopteryny (TH<sub>4</sub>). Wyróżnia się indukowalną (NOS2) i konstytutywną syntazę tlenku azotu (występującą jako izoformy: neuronowa – NOS1 i śródbłonkowa NOS3).

W ciągu ostatnich kilku lat wykazano działanie syntazy tlenku azotu u roślin, ale wciąż nie wyizolowano czynnego enzymu, nie zostały też zidentyfikowane geny kodujące NOS [49]. Większość danych na temat aktywności NOS została zresztą uzyskana metodami zaadaptowanymi z badań nad aktywnością enzymu pochodzącego z tkanek ssaków. Pośrednio, stwierdzono aktywność NOS zależną od argininy po traktowaniu korzeni roślin motylkowych (*Lupinus albus*) elicytorem bakteryjnym z *Rhizobium* [17]. Inny, dobrze udokumentowany przykład produkcji NO z L-argininy przez syntazę stanowią rezultaty badań [21,29] nad indukcją genów odporności (*PR-1* i *PAL*) u tytoniu (*Nicotiana tabacum*) pod wpływem wirusa mozaiki tytoniowej (TMV – *tobacco mosaic virus*). Do wykrywania aktywności NOS stosowano testy polegające na oznaczaniu zmian ilości <sup>3</sup>H lub <sup>14</sup>C L-cytruliny, produktu reakcji wytwarzania NO ze znakowanej radioaktywnie egzogennej L-argininy. Stwierdzono, że produkcja NO przez rośliny zainfekowane TMV zależy od L-argininy i kofaktorów NOS – NADPH, FAD i FMN.

Podanie inhibitorów NOS, takich jak: NMMA (octan L-N-metylo-L-argininy) i chlorek difenylojodonowy, powodowało z kolei zahamowanie bądź osłabienie produkcji białek związanych z reakcją obronną (*PR-1* i *PAL*). Wzmoczenie ich produkcji następowało też u niezakażonego wirusem tytoniu, po infiltracji liści NOS z ssaków, co sugeruje udział podobnych enzymów w reakcji na infekcje i potwierdza podobieństwo niektórych mechanizmów indukujących odporność u roślin i zwierząt.

Kaskada reakcji na patogen, zachodząca w hodowlach komórek soi (*Glycine max*) i liściach *Arabidopsis thaliana* zakażonych bakterią *Pseudomonas syringae* lub po podaniu NO w postaci donorów, była hamowana przez inhibitory ssaczy form NOS, takie jak: L-NNA (N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina) i PBITU (S,S'-1,3-phenylene-bis(1,2-ethanediył)-bis-isothiourea) [18,19]. Analogiczne efekty obserwowano u *A. thaliana*, naświetlanych promieniowaniem UV-B. Wykazano, iż inhibitor NOS (L-NAME, N-metylo-L-arginina) zapobiega ekspresji genu syntazy chalkonowej pobudzanej przez UV-B [34]. W kulturach tkanek cisu (*Taxus brevifolia*) również obserwuje się zahamowanie produkcji NO pod wpływem inhibitorów NOS, co sugeruje szerokie rozpowszechnienie tego enzymu w obrębie królestwa roślin [40,41].

Neuronowa NOS podlega aktywacji przez sojową kalmodulinę, przy równocześnie hamującym wpływie zmutowanej formy kalmoduliny (SCaM-1) [30]. Jest to kolejny przykład analogii w działaniu ze zwierzęcą NOS, ukazujący jeden z możliwych mechanizmów regulacji aktywności roślinnej NOS przez kalmodulinę.

Bardziej bezpośrednich danych o istnieniu roślinnego odpowiednika NOS dostarczyły badania wykorzystujące immunologiczną identyfikację i lokalizację białek, uzupełnione zastosowaniem inhibitorów i znakowanych substratów NOS. W wierzchołkach korzeni i liściach kukurydzy występuje białko o masie cząsteczkowej około 166 kDa, wykazujące

powinowactwo do przeciwciał przeciwko mysiej NOS2 oraz NOS1 z mózgu królika [42]. We frakcji zawierającej to białko wykryto aktywność NOS zależną od argininy. W tych samych wierzchołkach korzeni w cytoplazmie komórek strefy podziałów i jądrach w strefie wydłużania zlokalizowano immunofluorescencyjnie białko rozpoznawane przez powyższe przeciwciała. Ponadto, aktywność NOS zaobserwowano w chloroplastach komórek przyszparkowych epidermy liści *Kalanchoe daigremontiana* [40]. Obecność immunoreaktywnego białka o aktywności NOS stwierdzono w peroksosomach liści grochu [1]. W bibliotece cDNA grochu stwierdzono sekwencje częściowo homologiczne do ssaczych NOS, ale badania jeszcze trwają [16].

Wykazano też zależność aktywności NOS od jonów wapnia, co jest jeszcze jednym podobieństwem do ssaczej NOS, szczególnie konstytutywnej [49]. Z kolei zastosowanie inhibitora NOS2 – aminoguanidyny, silniej niż inne substancje hamowało aktywność NOS z peroksosomów [1,16]. Dlatego trudno przy obecnym stanie wiedzy pisać o większym podobieństwie roślinnych form enzymu do którejkolwiek z form zwierzęcych. Dopóki jednak enzym ten nie został wyizolowany i oczyszczony, ani nie poznano molekularno-genetycznego tła jego wytwarzania przez roślinę, można tylko mówić ogólnie o roślinnych NOS.

### Alternatywne źródła NO

NOS nie jest jedynym źródłem aktywnego fizjologicznie endogenego NO. Trzeba pamiętać o niezależnej od NOS, ale też enzymatycznej drodze biosyntezy NO, jak również o możliwości powstawania tej cząsteczki drogą nieenzymatyczną. Jednym ze sposobów nieenzymatycznych polega na chemicznej reakcji, zachodzącej pod wpływem światła między związkami tlenu i azotu (jak dwutlenek azotu  $\text{NO}_2$  i azotyn  $\text{NO}_2^-$ ) i metabolitami roślinnymi jak na przykład karotenoidy [15]. NO może także powstawać z azotynów przez redukcję w warunkach niskiego pH, wymaganego do przejścia azotynu w niezdysocjowaną formę kwasową [51].

Istnieje też droga enzymatycznej redukcji azotanów, poprzez azotyny do NO. Enzymami odpowiedzialnymi za te reakcje są reduktazy azotanowe (NR – *nitrate reductase*) [44,51,52]. Działanie NR polega na transferze elektronów z NADH lub NADPH na azotan. W normalnych warunkach powstały wskutek działania NR azotyn jest redukowany do jonów amonowych przez reduktazę azotynową działającą w chloroplastach. W szczególnych warunkach, na przykład stresu fotooksydacyjnego albo podczas zahamowania fotosyntezy, może dojść do zmniejszenia efektywności transportu azotynów do chloroplastów, co prowadzi do ich akumulacji. Azotyny stają się substratem dla NR, która przekształca je w tlenek azotu. Zwiększenie emisji NO jest rzeczywiście obserwowane w roślinach hodowanych w ciemności lub w warunkach nadmiernego oświetlenia [51,52]. Występowanie i charakterystyka NR zostały dokładnie opisane w literaturze [26,27,44,51,53]. W roślinach motylkowych znajduje się konstytutywna NR (cNR – EC 1.6.6.2) produkująca NO z azotynów. Podobną aktywność wykazuje indukowalna NR (iNR – EC 1.6.6.1) występująca w roślinach z innych rodzin (kukurydza, szpinak, tytoń, *A. thaliana* [26,44,51,53]. Yamasaki i Sakihama [53] na podstawie kinetyki produkcji NO sugerują, że w odpowiednich



warunkach to właśnie NR jest głównym źródłem tego gazu w procesach fizjologicznych, a jego wytwarzanie jest nie dodatkową, ale równie ważną jak redukcja  $\text{NO}_3^-$ , alternatywną funkcją tego enzymu. Na poparcie tego poglądu można dodać, że NR podlega złożonej kontroli i regulacji w komórce roślinnej. Regulacja odbywa się na różnych poziomach, od transkrypcji po inaktywację przez fosforylację z udziałem między innymi wapnia i białek 14-3-3 [26,27]. Tak wielokierunkowe mechanizmy sterujące wydają się przekraczać potrzeby związane wyłącznie z asymilacją azotanów jako składnika odżywczego. Co więcej, znany jest wpływ azotanów na procesy metaboliczne i rozwojowe, niewiele natomiast wiadomo o mechanizmach tego wpływu. Możliwe więc, że NR regulują te procesy właśnie poprzez produkcję NO.

Wynika więc z tego, iż w roślinie istnieją i działają przynajmniej dwa alternatywne źródła NO, ale wciąż nie jest rozstrzygnięte, który z tych mechanizmów odpowiada za konkretne funkcje NO, ani czy którykolwiek z nich przeważa w różnych warunkach indukujących jego produkcję.

## 2. DZIAŁANIE TLENKU AZOTU

Podkreśla się często wielokierunkowe działanie NO w organizmie roślinnym, czasami całkowicie przeciwne, a równocześnie zależne od wielu czynników wewnętrznych i środowiskowych [5,7,9,22,24,39,49]. Jedną z najbardziej oczywistych funkcji tego gazu jest regulacja reakcji na stres biotyczny i abiotyczny. Najlepiej zbadane jest znaczenie NO w indukcji odpowiedzi odpornościowej na atak patogenów. W jednym z pierwszych doniesień o fizjologicznej roli NO opisano jego wpływ na akumulację fitoaleksyn przez rośliny ziemniaka [38]. NO produkowany jest też podczas kontaktu korzeni łubinu z symbiotycznymi bakteriami brodawkowymi (*Bradyrhizobium*), co wskazuje na jego rolę w interakcji gospodarza z symbiontem [17]. Zgromadzono liczne dowody udziału NO w kilku mechanizmach reakcji na infekcję. W obronie rośliny duże znaczenie mają reaktywne formy tlenu (ROS) wytwarzane zarówno we wczesnej fazie odpowiedzi immunologicznej, jak i później, podczas uzyskiwania odporności systemicznej [9,25,39,48]. Rodniki tlenowe pełnią tu rolę zarówno bezpośredniej broni, jak i sygnałów wewnątrz- i międzykomórkowych. Do pobudzenia kaskady reakcji obronnych przez rodniki tlenowe niezbędny jest udział właśnie NO jako wtórnego przekaźnika sygnału. Jednym z wyraźniejszych objawów zlokalizowanej reakcji na stres, tak biotyczny (atak patogena) jak i uszkodzenie mechaniczne, radiacyjne czy termiczne, jest też obumieranie tkanek zachodzące wskutek programowanej śmierci komórek (PCD) [2], znane u roślin jako „*hypersensitive response*” (HR). Ze względu na podobny przebieg, PCD może być uważana za roślinny odpowiednik apoptozy [50]. W komórkach soi i *Arabidopsis thaliana* tlenek azotu wzmagal HR indukowaną przez  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a ponadto stymulował produkcję enzymów związanych z odpornością na stres – syntazy chalkonowej (CHS) i PAL [18]. Istnieje też związek NO z ciągiem reakcji stresowych związanych z indukcją kwasu salicylowego. U tytoniu

zaobserwowano wzrost ilości SA pod wpływem donorów NO [21,29]. SA jest podstawową substancją uczestniczącą w procesach odpornościowych u roślin, indukując między innymi produkcję białek związanych z patogenezą (PR-1) [14,29,35]. Wzrost poziomu tych białek jest u tytoniu pozytywnie skorelowany nie tylko z SA, ale i z NO, który jeszcze dodatkowo wzmacnia stymulujące działanie SA. Z kolei mutanty niezdolne do gromadzenia SA okazały się niewrażliwe również na NO. Równocześnie jednak NO oddziałuje na niezależny od kwasu salicylowego metabolizm fenylopropanowy, którego jednym z enzymów jest PAL [21]. Tą drogą powstają niektóre fitoaleksyny (m.in. pochodne izoflawonów). Jednocześnie PAL uczestniczy w biosyntezie SA. Wszystkie te mechanizmy nie tylko biorą udział w szybkiej odporności miejscowej, ale kształtują też nabytą odporność systemiczną organizmu roślinnego. Szczególnie ważną rolę mógłby odgrywać NO jako cząsteczka gazu o dużej zdolności do dyfuzji.

### NO a Programowana Śmierć Komórek

Istnieje wiele obserwacji potwierdzających udział NO w indukcji objawów apoptozy u roślin [5, 9,18,19,40,41], aczkolwiek nie brak też obserwacji wskazujących na przeciwdziałanie PCD przez tą substancję [3,4,5,19]. W komórkach soi zakażonych *Pseudomonas syringae* albo uszkodzonych mechanicznie zwiększenie produkcji  $H_2O_2$  poprzedzało objawy obumierania. W obecności niższych stężeń NO obumieranie było zintensyfikowane, natomiast podwyższenie stężenia NO powodowało zjawisko odwrotne – całkowite zatrzymanie obumierania. Istotną rolę odgrywa tu stosunek NO/ $H_2O_2$ , który indukuje apoptozę w zakresie 0,25 do 2 [19]. Bardziej jednoznacznie działa NO na komórki *Taxus brevifolia*, w których silnie indukuje PCD. Wpływ taki wywiera zarówno endogenne NO, produkowane przez komórki w odpowiedzi na stres grawitacyjny, jak i jego egzogenne donory. W tym wypadku to właśnie pozbawienie komórek NO przez zastosowanie wymiatacza lub inhibitora NOS zahamowuje fragmentację DNA i obumieranie [40,41]. Warto przy tym wspomnieć o interesującej korelacji szybkiego zwiększenia produkcji NO poprzedzającej apoptozę ze wzmożoną biosyntezą metabolitów wtórnych (u *T. brevifolia* – taksanów). Pomijając dość oczywiste potencjalne zastosowanie praktyczne tego zjawiska, może to też sugerować wpływ sygnałów NO na odległe procesy metaboliczne, a równocześnie wskazywać na mało poznane znaczenie niektórych substancji wtórnych w odporności na stres.

NO uczestniczy też, razem z rodnikami tlenowymi w reakcjach na promieniowanie UV. Badanie reakcji na promieniowanie UV-B u *Arabidopsis thaliana* [33] wykazały odrębność sygnałów pochodzących od aktywnych form tlenu stymulujących produkcję PR-1 i od NO, którego emisja poprzedzała ekspresję genu CHS. Wynika z tego, że NO na równi z SA, kwasem jasmonowym i rodnikami tlenowymi bierze udział w przystosowaniu rośliny do szkodliwego promieniowania.

Bezpośrednie działanie ochronne NO zostało stwierdzone także u ziemniaka (*Solanum tuberosum*) traktowanego herbicydami oraz zakażanego *Phytophthora infestans* [3]. Okazało się, że NO zapobiega zmianom chlorotycznym spowodowanym degradacją chlorofilu. Inne skutki podania NO w postaci donorów to zahamowanie

fragmentacji DNA, będącej wskaźnikiem apoptozy oraz obumierania fragmentów tkanki liścia. Na podstawie obserwacji o ograniczaniu skutków aktywności wolnych rodników tlenowych przez wysokie stężenia NO można przypuszczać, że jednym z bezpośrednich mechanizmów ochronnego działania jest reakcja nadmiaru NO z rodnikami ponadtlenkowymi, której produkty są mniej cytotoksyczne od samych ponadtlenków [3,5,19].

### NO jako regulator rozwoju

Odmianą grupą zaobserwowanych skutków działania NO są eksperymentalnie wywołane efekty o charakterze morfogenetycznym. Stymuluje on kiełkowanie będących w stanie spoczynku nasion kilku gatunków: *Lactuca sativa*, *Paulownia tomentosa*, *Emmenanthe penduliflora* [6,7]. Nie jest jednak jasne, czy działanie to ma również miejsce w naturze, choć można przypuszczać, że NO wytwarzany przez mikroflorę glebową mógłby być sygnałem do przerywania spoczynku przez nasiona. W dojrzewających organach zmniejsza się produkcja NO, a pod wpływem jego donorów następuje przyspieszenie wzrostu, ale opóźnienie starzenia się organów, tak wegetatywnych (liście) jak i generatywnych (owoce). Działanie to jest ujemnie skorelowane z obecnością etylenu, regulatora procesów dojrzewania i starzenia się [32]. Szczegóły powiązań między tymi dwoma gazami pozostają jednak wciąż nieodkryte. Wiadomo też o udziale NO w tworzeniu i wzroście korzeni bocznych i przybyszowych u ogórka, lawendy oraz bulw ziemniaka [7]. Poza tym tlenek azotu stymuluje też deetiolację siewek i zahamowanie wydłużania międzywęźli roślin pozbawionych dostępu światła [4]. Uczestnictwo w przekazywaniu bodźców świetlnych jest więc kolejną funkcją NO.

Z tą ostatnią rolą wiąże się też regulacja rozwarcia aparatów szparkowych, w której uczestniczy NO. Przyspiesza on i intensyfikuje zamykanie szparek wskutek przynajmniej niektórych bodźców, z których jednym jest wysychanie. U kilku gatunków roślin jednoliściennych i dwuliściennych donory NO obniżały intensywność transpiracji o 20%, zwiększając retencję wody w roślinach. Równocześnie obserwowano zwiększenie stopnia przymknięcia szparek, hamowane z kolei przez wymiatacze NO [23]. Adaptacyjna rola NO przejawia się więc także przez regulację gospodarki wodnej organizmu.

Szybkie zamykanie szparek pod wpływem kwasu abscysynowego (ABA) odbywa się właśnie za pośrednictwem NO powstającego wskutek aktywności NOS [37]. W doświadczeniach z donorami NO wykazano odwracalną reakcję aparatów szparkowych podobną jak przy traktowaniu rośliny ABA. Wymiatanie NO lub zastosowanie inhibitorów NOS zapobiegało indukowanemu przez ABA zamknięciu szparek. Stwierdzoną we wcześniejszych badaniach [40] aktywność syntazy tlenu azotu w komórkach przyszparkowych *Kalanchoe daigremontiana* można więc wytłumaczyć jej miejscowym udziałem w regulacji funkcji aparatów szparkowych. Obiecującą obserwacją jest potwierdzenie podobnego wpływu NO na *Arabidopsis thaliana*, co pozwoli na wykorzystanie znanych u tego modelowego gatunku mutantów biosyntezy

ABA oraz niewrażliwych na ten regulator, do pełnego opisu mechanizmów transdukcji sygnału przez NO [37].

### 3. MECHANIZMY DZIAŁANIA TLENKU AZOTU

#### Drogi przekazywania sygnału od NO

U zwierząt transdukcja sygnału NO odbywa się przez cGMP, drogą aktywacji przezeń cykazy guanylowej, a także drogą alternatywną określaną jako niezależna od cGMP [22,49]. W roślinach także działa cGMP, a jego funkcje to między innymi stymulacja ekspresji genów kodujących CHS, pośrednictwo w działaniu giberelin oraz bodźców świetlnych odbieranych przez układ fitochromowy [22]. Są również badania wskazujące na udział cGMP w transdukcji sygnałów od tlenku azotu. U tytoniu wzrost ilości NO poprzedzał gwałtowne podwyższenie poziomu cGMP, a podanie egzogenego analogu cGMP wywoływało charakterystyczne dla NO efekty w postaci ekspresji genów związanych z reakcją odpornościową. Równocześnie, ekspresja tych genów była zahamowana przez egzogenne inhibitory cykazy guanylowej. Enzym ten stanowi więc składnik kaskadowej reakcji na NO. Jednym z następnych etapów tej kaskady jest też produkcja cADP-rybozy (cADPR), kolejnego przekaźnika sygnału, którego podanie dolistnie zwiększa produkcję białek związanych z odpornością (PAL i PR-1) [21,29]. cGMP u roślin, podobnie jak u ssaków może aktywować kinazy białkowe wpływające następnie na produkcję cADPR [29]. Działanie cADPR i jego rola jako wtórnego przekaźnika sygnałów NO nie jest jeszcze szczegółowo wyjaśniona. W wymienianych badaniach stwierdzono tylko hamujący wpływ blokera kanałów wapniowych – czerwieni rutenowej na aktywację białek PR-1, a brak takiego hamowania w stosunku do PAL. Wyniki te wskazują na odrębność dróg aktywacji genów *CHS* i *PR-1* przez cADPR i udział jonów wapnia w przynajmniej jednej z nich. Jest również prawdopodobne istnienie omijających cADPR dróg przekazu sygnału od NO, podobnie jak u ssaków. Mogą to być zależne od cGMP kinazy działające bez pośrednictwa cADPR albo kanały wapniowe regulowane bezpośrednio przez NO. Warto jeszcze w tym miejscu wspomnieć o ciekawym odkryciu wskazującym na udział cGMP w procesach regulowanych przez NO oraz na podobieństwa tych procesów u roślin i ssaków. Otóż okazuje się, że powszechnie znany lek wzmagający potencję – cytrynian sildenafilu (Viagra®) zapobiega więdnieniu kwiatów ciętych [43]. Lek ten opóźnia rozkład cGMP, produkowanego przez roślinę pod wpływem NO, co z kolei zmniejsza syntezę etylenu będącego stymulatorem starzenia się. Te wyniki potwierdzają rolę cGMP-zależnych sygnałów w regulacji dojrzewania i starzenia się organizmu roślinnego. Udział NO w hormonalnej regulacji procesów morfogenetycznych potwierdzają obserwacje zwiększenia jego produkcji pod wpływem cytokinin [46]. Hormony tej grupy regulują wzrost i dojrzewanie organów, stymulują produkcję chlorofilu oraz zwiększają częstość podziałów komórkowych. Jest więc możliwe, że i te procesy są kontrolowane za pośrednictwem NO.

## Wpływ na enzymy oksydacyjne

Wielokierunkowość działania NO oznacza też istnienie odrębnych dróg transdukcji sygnału również u roślin. Podobnie jak u ssaków, u *Nicotiana tabacum* NO hamuje aktywność cytoplazmatycznej i mitochondrialnej akonitazy oraz mitochondrialnych oksydaz cytochromowych [11,34,54]. Ograniczanie przez NO aktywności enzymów oddechowych może odgrywać ważną rolę w indukcji szybkiej odpowiedzi odpornościowej typu HR oraz w uruchomieniu alternatywnej nie-cytochromowej oksydazy mitochondrialnej (AOX). AOX odgrywa ważną rolę w zależnym od SA hamowaniu replikacji i rozprzestrzeniania się niektórych wirusów (TMV, CMV, AIMV i PVX)[35]. Inną funkcją akonitazy, na którą wpływa NO, jest regulacja gospodarki jonami żelaza. U ssaków NO przekształca akonitazę cytoplazmatyczną w białko IRP-1 (*iron regulatory protein*), które zwiększa poziom wolnych jonów żelaza. U roślin jednak takie działanie akonitazy jest wciąż hipotetyczne. Wzmoczone uwalnianie jonów żelaza miałyby duże znaczenie w procesach odpornościowych, polegających na produkcji wolnych rodników hydroksylowych w reakcji Fentona [47]. Poparciem tej hipotezy jest wykazana dzięki sklonowaniu genu kodującego cytoplazmatyczną akonitazę tytoniu (NtACO1) duża homologia sekwencji NtACO1 do ludzkiej IRP-1 [29].

Wciąż nie wiadomo, jak NO wpływa na zmianę aktywności regulowanych przezeń białek. Prawdopodobny jest mechanizm S-nitrozylacji, który mógłby na przykład działać na kanały wapniowe przy niezależnej od cGMP aktywacji PR-1.

## Tlenek azotu a kinazy białkowe

Mechanizm aktywacji kinaz białkowych przez NO zachodzącej na skutek indukcji elicytorami patogenów nie jest jeszcze poznany [31]. U tytoniu pobudzanego tak do reakcji odpornościowej stwierdzono zwiększenie aktywności kinaz indukowanych SA (SIPK – *salicylic acid-induced protein kinase*) i indukowanych zranieniem (WIPK – *wounding-induced protein kinase*). Kinazy indukowane SA, ale nie WIPK, były również aktywowane przez tlenek azotu. Są one więc jeszcze jednym składnikiem szlaku przekazywania sygnału od NO poprzez SA, chociaż ich funkcja w ciągu reakcji odpornościowych nie jest wciąż jasna. Kaskady kolejnych aktywacji roślinnych kinaz białkowych są coraz dokładniej opisywane [8]. W odpowiedzi na bodziec stresowy kinazy typów SIPK i WIPK mogą być aktywowane kinazą MAPK (MAPKK), a ta z kolei kinazą MAPKK (MAPKKK) [8,39]. Jest prawdopodobne, że w łańcuchu tym bierze udział NO, dowodów na to jednak nie znaleziono.

## Tlenek azotu w interakcji z innymi wolnymi rodnikami

Trzeba również wspomnieć o mechanizmach działania NO bezpośrednio związanych z jego wolnorodnikowym charakterem. NO jako związek bardzo reaktywny może reagować w kontakcie z ROS np. anionorodnikiem ponadtlenkowym  $O_2^-$ , którego ilość wzrasta natychmiast po zadziałaniu czynników stresowych, przekształcając się w rodnik peroksyazotynowy (inaczej peroksynitrylowy) –  $ONOO^-$ . Pomiedzy tymi

czterema cząsteczkami ( $\text{NO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{ONOO}^-$ ) istnieją złożone relacje zależne od wzajemnych proporcji ilościowych i stanu fizjologicznego rośliny. Obronny wybuch tlenowy zachodzący pod wpływem stresu i zwiększona produkcja  $\text{NO}$  działają synergistycznie w indukcji PCD soi, ale nie pośredniczy w tym  $\text{ONOO}^-$  [19]. Działanie indukujące apoptozę przypisuje się produkowanemu przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD)  $\text{H}_2\text{O}_2$ , który może być źródłem toksycznych cząsteczek, takich jak: rodnik hydroksylowy.  $\text{NO}$  odgrywałby tu rolę czynnika tworzącego sprzyjające warunki, na przykład przez uwalnianie jonów żelaza z białek typu IRP-1. Poziom  $\text{NO}$  ma w tych zależnościach kluczowe znaczenie [10,19]. W nadmiarze  $\text{NO}$  pełni funkcję zmiatacza wobec rodnika ponadtlenkowego tworząc  $\text{ONOO}^-$ , który nie wykazuje tak silnego działania indukującego apoptozę, równocześnie uniemożliwiając powstawanie wystarczających ilości  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Z kolei przy niedoborze  $\text{NO}$  w stosunku do  $\text{O}_2^-$ , jest on zużywany w reakcji tworzenia peroksyazotynu, co powoduje brak warunków do przejścia  $\text{H}_2\text{O}_2$  w rodniki hydroksylowe. Sam rodnik peroksyazotynowy ma działanie toksyczne w stosunku do patogenów, więc mógłby być pierwotną ewolucyjnie formą immunologicznego wykorzystania  $\text{NO}$ . Rodnik  $\text{ONOO}^-$  może zresztą powstawać też w drodze enzymatycznej, przez utlenienie  $\text{NO}$  przez reduktazę azotanową [53]. Byłaby to jeszcze jedna funkcja tego powszechnie występującego enzymu biorącego udział w przyswajaniu azotu. Nitrozotiole – jak nitrozoglutation (GSNO) powstający przez bezpośrednią nitrozylację glutationu przez  $\text{NO}$  mogą być wykorzystywane przez roślinę w obronie przed chorobami infekcyjnymi [22,24]. Są one rozprowadzane po całym organizmie rośliny, gdzie wspomagają nabytą odporność systemiczną.

Wysokie powinowactwo  $\text{NO}$  do rodnika ponadtlenkowego jest przykładem bezpośredniego działania antyoksydacyjnego. Efekt ten jest dodatkowo wzmacniany przez omówione wyżej hamowanie aktywności oksydaz cytochromowych i akonitazy [11, 31, 36, 54].

#### 4. PROBLEMY I PERSPEKTYWY BADAWCZE NA NAJBLIŻSZĄ PRZYSZŁOŚĆ

Poniżej przedstawione są najważniejsze zdaniem autora zagadnienia dotyczące  $\text{NO}$  u roślin, które powinny być rozwiązane w przyszłości.

Dokładne zbadanie pochodzenia endogennego  $\text{NO}$  w różnych sytuacjach stymulujących jego syntezę. Niezbędne jest ostateczne potwierdzenie istnienia u roślin syntazy  $\text{NO}$  analogicznej do zwierzęcych NOS oraz poznanie budowy enzymu i charakterystyka molekularna genów kodujących NOS. Do rozstrzygnięcia pozostaje problem interakcji między roślinną NOS i reduktazami azotanowymi jako alternatywnymi źródłami endogennego tlenu azotu.

Zbadanie mechanizmów regulacji produkcji  $\text{NO}$  pod wpływem bodźców o charakterze stresowym oraz w przebiegu procesów rozwojowych. Wciąż nie są wyjaśnione drogi aktywacji bądź hamowania produkcji  $\text{NO}$  przez poszczególne czynniki środowiskowe i wewnętrzne.

Zebranie większej ilości danych o zależnościach między NO a innymi regulatorami wzrostu i rozwoju. Badania takie zostały rozpoczęte w stosunku do cytokininy ABA [37,46], a niektóre dane wskazują też na związek NO z giberelinami, etylenem, a pośrednio również z auksynami [6, 32, 39, 43].

Wyjaśnienie ewentualnej roli NO w reakcjach na inne czynniki stresowe, takie jak: zimno, zasolenie, niedotlenienie, substancje toksyczne (np. pestycydy).

Rozpoznanie zależnych i niezależnych od cGMP dróg przekazywania sygnału od NO oraz bezpośredniego działania NO na procesy oksydoredukcyjne. Ważne jest wyjaśnienie mechanizmów, dzięki którym komórki roślinne w różny sposób, zależnie od sytuacji, reagują na NO, co prawdopodobnie leży u podstaw jego wielokierunkowego działania. W rozwiązaniu tych problemów bardzo pomocne powinny stać się mutanty *Arabidopsis thaliana* niewrażliwe na NO albo którykolwiek z przypuszczalnych składników przekazywania sygnału.

Udoskonalenie technik umożliwiających wykrycie i śledzenie *in vivo* jak najmniejszych wahań produkcji NO w ciągu życia rośliny. Nie wiadomo bowiem, czy NO jest produkowany również niezależnie od czynników stresowych czy innych bodźców zewnętrznych jako konstytutywny regulator procesów fizjologicznych, więc jego znaczenie powinno być wyjaśnione.

Istotnym aspektem, zwłaszcza w odniesieniu do potencjalnych zastosowań praktycznych jest powiązanie NO z regulacją metabolizmu wtórnego. Ważną wskazówką powinny się stać obserwacje wpływu substancji roślinnych na produkcję i działanie NO u ssaków. Wpływ taki, hamujący lub stymulujący wywierają zarówno wieloskładnikowe ekstrakty roślin leczniczych [28,55], jak i czyste substancje, na przykład flawonoidy [12,13]. Do wyjaśnienia pozostaje ważne zagadnienie roli i mechanizmów działania wielu produktów metabolizmu wtórnego w fizjologii roślin. Możliwe, że NO podobnie jak w komórkach ssaków podlega regulacji przez tego typu związki, wpływając zarazem na ich metabolizm. Rysują się przy tym szerokie perspektywy poszukiwania nowych fitoterapeutyków oraz udoskonalenia biotechnologicznego pozyskiwania substancji leczniczych pochodzenia roślinnego.

## 5. UWAGI KOŃCOWE

W rezultacie dotychczasowych odkryć okazało się, że NO jest u roślin powszechnym pośrednikiem w wielu procesach fizjologicznych. Jego właściwości, takie jak: wolnorodnikowy charakter cząsteczki, jej niewielkie rozmiary i przenikliwość, łatwość wchodzenia w reakcje utleniania i redukcji z różnymi cząsteczkami organicznymi i nieorganicznymi, sprawiają, iż poza rolą w immunologii i biologii stresu u roślin, może być on kluczowym elementem wielu spośród niezbadanych jeszcze procesów. Może być więc uznany zarówno za niekonwencjonalny regulator wzrostu i rozwoju, jak i za uniwersalny w świecie żywym przekaźnik bodźców stresowych, a jego rola w miarę kontynuacji badań będzie się z pewnością okazywać coraz większa.

## LITERATURA

- [1] BARROSO JB, CORPAS FJ, CARRERAS A, SANDALIO LM, VALDERRAMA R, PALMA JM, LUPIÁÑEZ JA, DEL RÍO LA. Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxysomes. *J Biol Chem* 1999; **274**: 36729-36733.
- [2] BEERS EP, MCDOWELL JM. Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 561-567.
- [3] BELIGNI MV, LAMATTINA L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. *Nitric Oxide* 1999; **3**: 199-208.
- [4] BELIGNI MV, LAMATTINA L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta* 1999; **208**: 337-344.
- [5] BELIGNI MV, LAMATTINA L. Is nitric oxide toxic or protective? *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 299-300.
- [6] BELIGNI MV, LAMATTINA L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 2000; **210**: 215-221.
- [7] BELIGNI MV, LAMATTINA L. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 508-509.
- [8] BENT AF. Plant mitogen-activated protein kinase cascades: Negative regulatory roles turn out positive. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 784-786.
- [9] BOLWELL GP. Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 287-294.
- [10] CARO A, PUNTARULO S. Nitric oxide decreases superoxide anion generation by microsomes from soybean embryonic axes. *Physiol Plant* 1998; **104**: 357-364.
- [11] CARO A, PUNTARULO S. Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. *Free Radic Res* 1999; **31**: 205-212.
- [12] CHEN Y-C, YANG L-L, LEE TJF. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Biochem Pharmacol* 2000; **59**: 1445-1457.
- [13] CHEN Y-C, SHEN S-C, CHEN L-G, LEE TJ-F, YANG L-L. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expressions induced by nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol* 2001; **61**: 1417-1427.
- [14] COHN J, SESSA G, MARTIN GB. Innate immunity in plants. *Curr Opinion in Immunol* 2001; **13**: 55-62.
- [15] COONEY RV, HARWOOD PJ, CUSTER LJ. Light mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ Health Perspect* 1994; **102**: 460-462.
- [16] CORPAS FJ, BARROSO JB, DEL RÍO LA. Peroxysomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 145-150
- [17] CUETO M, HERNANDEZ-PERERA O, MARTIN R, BENTURA ML, RODRIGO J, LAMAS S, GOLVANO MP. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett* 1996; **398**: 159-164.
- [18] DELLEDONNE M, XIA Y, DIXON RA, LAMB C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 1998; **394**: 585-588.
- [19] DELLEDONNE M, ZEIER J, MAROCCO A, LAMB C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 13454-13459.
- [20] DEREBECKA N, HOLYSZ M, TRZECIAK WH. Geny syntaz tlenku azotu: struktura, regulacja ekspresji, produkty białkowe. *Post Biochem* 2000; **46**: 130-139.
- [21] DURNER J, WENDEHENNE D, KLESSIG DF. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 10328-10333.
- [22] DURNER J, KLESSIG DF. Nitric oxide as signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 369-374.
- [23] GARCIA-MATA C, LAMATTINA L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol* 2001; **126**: 1196-1204.
- [24] HAUSLADEN A, STAMLER JS. Nitric oxide in plant immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 10345-10347.
- [25] HEATH MC. Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* 2000; **3**: 315-319.



- [26] HUBER SC, BACHMANN M, HUBER JL. Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for  $Ca^{2+}$  and 14-3-3 proteins. *Trends Plant Sci* 1996; **1**: 432-438.
- [27] KAISER WM, WEINER H, HUBER SC. Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. *Physiol Plant* 1999; **105**: 384-389.
- [28] KIM H-M, MOON E-J, LI E, KIM K-M, NAM S-Y, C-K. CHUNG C-K. The nitric oxide-producing activities of *Scutellaria baicalensis*. *Toxicology* 1999; **135**: 109-115.
- [29] KLESSIG DF, DURNER J, NOAD R, NAVARRE DA, WENDEHENNE D, KUMAR D, ZHOU JM, SHAH J, ZHANG S, KACHROO P, TRIFA Y, PONTIER D, LAM E, SILVA H. Nitric oxide and salicylic acid signalling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 8849-8855.
- [30] KONDO R, TIKUNOVA SB, CHO MJ, JOHNSON JD. A point mutation in a plant calmodulin is responsible for its inhibition of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1999; **274**: 36213-36218.
- [31] KUMAR D, KLESSIG DF. Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals: nitric oxide, salicylic acid, ethylene and jasmonic acid. *Mol Plant Microbe Interact* 2000; **13**: 347-351.
- [32] LESHEM YY, WILLS RBH, VENG-VA KU V. Evidence for the function of the free radical gas – nitric oxide ( $NO^{\cdot}$ ) – as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol Biochem* 1998; **36**: 825-833.
- [33] MACKERNESS SA-H, JOHN F, JORDAN B, THOMAS B. Early signalling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett* 2001; **489**: 237-242.
- [34] MILLAR AH, DAY D. Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett* 1996; **398**: 155-158.
- [35] MURPHY AM, CHIVASA S, SINGH DP, CARR JP. Salicylic acid-induced resistance to viruses and other pathogens: a parting of the ways? *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 155-160.
- [36] NAVARRE DA, WENDEHENNE D, DURNER J, NOAD R, KLESSIG DF. Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol* 2000; **122**: 573-582.
- [37] NEILL SJ, DESIKAN R, CLARKE A, HANCOCK JT. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* 2002; **128**: 13-16.
- [38] NORITAKI T, KAWAKITA K, DOKE N. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissue. *Plant Cell Physiol* 1996; **37**: 113-116.
- [39] NÜRNBERGER T, SCHEEL D. Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 372-378.
- [40] PEDROSO MC, MAGALHAES JR, DURZAN DJ. A nitric oxide burst precedes apoptosis in an angiosperm and gymnosperm. *J Exp Bot* 2000; **51**: 1027-1036.
- [41] PEDROSO MC, JR MAGALHAES JR, DURZAN DJ. Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. *Plant Sci* 2000; **157**: 173-181.
- [42] RIBEIRO EA JR, CUNHA FQ, TAMASHIRO WMSC, MARTINS IS. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett* 1999; **445**: 283-286.
- [43] SIEGEL-ITZKOVICH J. Viagra makes flowers stand up straight. *Br Med J* 1999; **319**: 274.
- [44] STITT M. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr Opin Plant Biol* 1999; **2**: 178-188.
- [45] STUEHR D, POU S, ROSEN GM. Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* 2001; **276**: 14533-14536.
- [46] TUN NN, HOLK A, SCHERER GFE. Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Lett* 2001; **509**: 174-176.
- [47] URBĄŃSKI NK, BERĘSEWICZ A. Generation of OH initiated by interaction of  $Fe^{2+}$  and  $Cu^{+}$  with dioxygen; comparison with the Fenton chemistry. *Acta Biochim Pol* 2000; **47**: 951-962.
- [48] VAN CAMP W, VAN MONTAGUM.  $H_2O_2$  and NO: redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci* 1998; **3**: 330-334.
- [49] WENDEHENNE D, PUGIN A, KLESSIG DF, DURNER J. Nitric oxide: comparative synthesis and signalling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 177-183.
- [50] WOJCIECHOWSKA M. Symptomy programowanej śmierci komórek podczas rozwoju roślin. *Post Biol Kom* 2001; **28**: 317-333.
- [51] YAMASAKI H, SAKIHAMA Y, TAKAHASHI S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci* 1999; **4**: 128-129.
- [52] YAMASAKI H. Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition *in vivo*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2000; **355**: 1477-1488.

- [53] YAMASAKI H, SAKIHAMA Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* 2000; **468**: 89-92.
- [54] YAMASAKI H, SHIMOJI H, OHSHIRO Y, SAKIHAMA Y. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide* 2001; **5**: 261-270.
- [55] YOSHIKAWA M, MORIKAWA T, TOGUCHIDA I, HARIMA S, MATSUDA H. Medicinal flowers II. Inhibitors of nitric oxide production and absolute stereostructures of five new germacrane-type sesquiterpenes, kikkanols D, D monoacetate, E,F, and F monoacetate from the flowers of *Chrysanthemum indicum* L. *Chem Pharm Bull* (Tokyo) 2000; **48**: 651-656.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 26.03.2002 r.*

*Przyjęto: 30.04.2002 r.*

*Adres autora: ul. Jana Kochanowskiego 10, 51-601 Wrocław*

*e-mail: am9@biol.am.wroc.pl*

# PLAZMODESMY, JAKO ELEMENT SYSTEMU KOMUNIKACJI W ROŚLINACH

PLASMODESMATA  
AS THE PART OF THE COMMUNICATION SYSTEM IN PLANTS

Paweł SOWIŃSKI

Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin  
w Radzikowie

*Streszczenie:* Plazmodesmy – kanały cytoplazmatyczne łączące komórki – stanowią jedną z cech odróżniających budowę komórkową roślin od zwierząt. Mimo że plazmodesmy odkryto ponad sto lat temu, dopiero w ostatniej dekadzie przybliżono się do zrozumienia ich roli w regulacji wymiany metabolitów i związków sygnałowych między komórkami. Szczególnie interesujące są dane odnoszące się do funkcji plazmodesm w regulacji ponadkomórkowego transportu białek i kwasów nukleinowych. Najnowsze doniesienia sugerują, że makromolekuły te mogą pełnić rolę nośników informacji w nieznanym wcześniej układzie sygnalizacji u roślin.

*Słowa kluczowe:* apoplast, floem, plazmodesmy, sygnalizacja, symplast, transport krótkodystansowy, wirusy roślinne, związki wielkocząsteczkowe

*Summary:* Plasmodesmata – cytoplasmic bridges joining cells – are one of the features specific to plants. In spite of discovery of plasmodesmata as early as more than 100 years ago, the mechanism of their functioning as the way for metabolite and signalling molecules exchange between cells was not clear until the last decade. The information on plasmodesmata role in protein and nucleic acids transport are of particular interest. Current discoveries suggest existing in plants the new communication system, involving proteins and/or nucleic acids as signalling molecules.

*Key words:* apoplast, macromolecules, phloem, plant wiruses, plasmodesmata, signalling, short distance transport, symplast

## 1. WSTĘP

Plazmodesmy zostały opisane więcej niż sto lat temu i od początku fascynują wielu badaczy. Ich nazwa – oznaczająca więzadła między cytoplazmami – została nadana w 1901 r. przez wielkiego botanika Edwarda Strassburgera. Obecność plazmodesm

jest jedną z cech odróżniających budowę komórkową roślin od zwierząt. Ich istnienie powoduje, że komórki roślinne tworzą w zasadzie jedną całość nazywaną symplastem, zanurzoną w apopląście, na który składają się ściany komórkowe i przestrzenie międzykomórkowe. Dopiero jednak ostatnie lata przyniosły przełom w naszej wiedzy o funkcjonowaniu plazmodesm. Szczególnie interesujące są informacje o międzykomórkowym czy nawet międzyorganowym transporcie związków wielkocząsteczkowych. Dane te sugerują istnienie u roślin nieznanego wcześniej układu sygnalizacji w roślinie. Szczególną rolę w funkcjonowaniu tego układu pełnią plazmodesmy i floem. Poznanie tej roli było możliwe dzięki badaniom prowadzonym w różnych dziedzinach: anatomii, embriologii, biochemii, biologii molekularnej i wirusologii. Natomiast integracja wyników tych badań, zrozumienie ich znaczenia i wysunięcie hipotez wyznaczających nowe kierunki badań jest zadaniem fizjologii roślin.

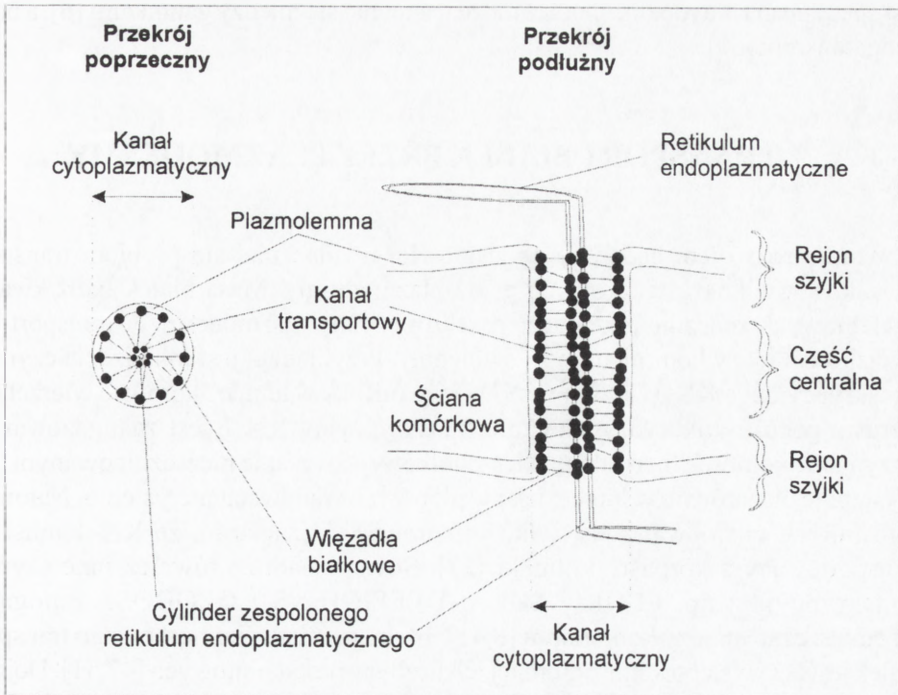
## 2. BUDOWA PLAZMODESM I TRANSPORT ZWIĄZKÓW NISKOCZĄSTECZKOWYCH

Plazmodesmy są to proste lub rozgałęziające się cytoplazmatyczne połączenia komórek przechodzące przez kanały w ścianach komórkowych. W strefie centralnej, kanały te mają średnicę około 60 nm. Przez plazmodesmę przechodzi rdzeń w postaci cylindra zespolonego retikulum endoplazmatycznego połączony z plazmalemą więzadłami [14] z miozyny i/lub aktyny [4,42]. Między plazmalemą a cylindrem ER występują kanały transportowe o średnicy ok. 2,5 nm [7].

Przepływ związków niskocząsteczkowych przez plazmodesmy odbywa się w drodze dyfuzji. Przepływ ten jest prawie o 2 rzędy wielkości wolniejszy lub tyle samo szybszy co odpowiednio dyfuzja w czystej wodzie [5,52] i transport przez błony [40]. Przemieszczanie metabolitów przez plazmodesmy może się też odbywać w drodze przepływu masowego, tzn. ruchu związków rozpuszczonych wraz z wodą pod wpływem różnicy ciśnień między komórkami [5,39].

Plazmodesmy przepuszczają z reguły związki o masie nie większej niż około 1 kDa, a więc wodę, cukry, jony i małe związki sygnałowe [44]. Wartość ta jest określana w tym artykule jako przekrój czynny plazmodesmy (ang. *size exclusion limit*). Zdolność do przemieszczania konkretnego związku zależy nie tylko od jego masy, ale też od jego ładunku, kształtu cząsteczki i innych własności. Plazmodesmy nie przepuszczają ujemnie naładowanych cząstek hydrofilowych, a także pewnych aminokwasów i związków pokrewnych, jak np. pochodna tryptofanu, kwas indoliloctowy (IAA) [53]. Natomiast drogą symplastyczną mogą się przemieszczać inne hormony roślinne, gibereliny [31].

Generalnie przyjmuje się, że transport międzykomórkowy odbywa się w kanałach transportowych, jednak nie można wykluczyć, że związki niskocząsteczkowe, szczególnie lipidy i cukry mogą się przemieszczać w cylindrze ER [19,20,23]. Dyfuzja przez plazmodesmy może być regulowana przez różnicę stężeń danego związku bądź ciśnienia hydrostatycznego w sąsiednich komórkach. Przepuszczalność plazmodesm



RYCINA 1. Schemat budowy plazmodesmy. W świetle kanału cytoplazmatycznego o średnicy ok. 60 nm znajduje się rdzeń w postaci cylindra zespolonego retikulum endoplazmatycznego połączonego z plazmalemą wiązadłami białkowymi. Transport białek, kwasów nukleinowych i innych związków wielkocząsteczkowych o masie przekraczającej podstawowy przekrój czynny plazmodesmy (850 Da) odbywa się w kanałach transportowych (średnica 2,5 do 3,5 nm) znajdujących się między plazmalemą a rdzeniem, natomiast dyfuzja związków niskocząsteczkowych może odbywać się zarówno w kanałach transportowych, jak i w cylindrze retikulum

może być również zmieniana przez zamykanie ich światła przez kalozę odkładającą się po zewnętrznej stronie błony komórkowej [58]. Udrażnianie plazmodesm następuje przez enzymatyczne usuwanie kalozy. Przepuszczalność plazmodesm może się też zmieniać pod wpływem czynników środowiska. Sugerowano, że w niskiej temperaturze cylinder ER traci swą przepustowość dla sacharozy i innych związków niskocząsteczkowych [19], a obniżenie potencjału osmotycznego może powodować przejściowe zwiększanie się średnicy plazmodesm [48].

Intensywność wymiany metabolitów może też zależeć od liczby plazmodesm łączących dane komórki. Dla przykładu, natężenie fotosyntezy netto u traw  $C_3$  i  $C_4$  koreluje dobrze z częstością plazmodesm na styku mezofil-pochwy okołowiązkowe [6]. Ponadto, liczba plazmodesm na styku parenchyma-kompleks komórki towarzyszące/rurki sitowe może determinować drogę, jaką asymilaty przemieszczają się do floemu – przez symplast lub z apoplastu [18]. Uważa się [17], że ta ostatnia wielkość

jest specyficzna dla rodzin, chociaż może też różnić się między gatunkami [6], a nawet podgatunkami [50].

### 3. TRANSPORT BIAŁEK PRZEZ PLAZMODESMY

Wraz z rozwojem badań coraz jaskrawiej uwidaczniał się problem transportu związków wielkocząsteczkowych przez plazmodesmy. Masa białek bądź kwasów nukleinowych znacznie przekracza przekrój czynny plazmodesm. A transport tych związków między komórkami jest ewidentny. Przykładem jest lokalizacja czynnika transkrypcyjnego KNOTTED 1 (KN1) i jego mRNA w tunice i korpusie wierzchołka wzrostu pędu u kukurydzy. Czynniki transkrypcyjne KN 1 jest zaangażowany w utrzymanie komórek merystemu wierzchołkowego w stanie niezróżnicowanym [49]. Występuje on zarówno w tunice, jak i w głębszych warstwach merystemu. Natomiast jego mRNA znajduje się tylko w korpusie. Oznacza to, że KN 1 musi być transportowany z korpusu do tuniki [27]. Stwierdzono, że również inne czynniki transkrypcyjne, np. FLORICAULA, DEFFICIENS i GLOBOSA mogą się przemieszczać między komórkami [8,41]. Efektem międzykomórkowego transportu białek jest też występowanie ogromnej ich liczby w rurkach sitowych [47,51]. Dojrzałe rurki sitowe u roślin okrytonasiennych nie zawierają jądra, toteż wszystkie białka w nich występujące pochodzą z zewnątrz.

Rozwiązanie problemu, jakim jest mechanizm transportu białek przez plazmodesmy, przyszło z wirusologii. Wirusy, w tym roślinne, są to cząstki kwasu nukleinowego z białkową osłoną. Po zakażeniu, namnażają się w komórce i przemieszczają dalej do innych organów przez plazmodesmy, a dalej przez floem. W przypadku niektórych typów wirusów pewne białka z ich osłonki mają zdolność okresowego zwiększenia przekroju czynnego plazmodesm tak, że mogą one przepuszczać kompleksy kwasu nukleinowego i białka [13,16,38,55]. Białka te określane są obecnie wspólną nazwą MP (ang. *movement protein*). Umożliwiają one wirusowi przemieszczanie przez okresowe otwieranie kanału transportowego.

Uważa się, że wirusy wykorzystały istniejący już w roślinach mechanizm umożliwiający transport białek i kwasów nukleinowych między komórkami [35]. Ewolucja wirusów mogła polegać na dołączeniu do kwasu nukleinowego wirusa mRNA białek endogennych, zaangażowanych w regulację przekroju czynnego plazmodesm roślin. Wydaje się bowiem nieprawdopodobne, aby wirusy wytworzyły w roślinach mechanizm nieistniejący tam wcześniej. Obecnie przyjmuje się, że mechanizm ten może odgrywać kluczową rolę w regulacji wzrostu i rozwoju rośliny na poziomie tkankowym i wyższym [34].

Istnieje kilka hipotez odnoszących się do mechanizmu transportu białek przez plazmodesmy [11,36]. Jedna z nich zakłada, że przyłączenie transportowanego polipeptydu do receptora cytozolowego, a następnie do białka dokującego zlokalizowanego w rejonie szyjki plazmodesmy otwiera kanał transportowy. Po przejściu

przez ten kanał białko jest kierowane do cytozolu lub jądra za pośrednictwem cytoszkieletu. Inna hipoteza zakłada udział białek opiekuńczych. Zmieniają one strukturę danego białka do formy transportowej. Po przejściu przez kanał transportowy zachodzi proces odwrotny. Możliwe jest też przemieszczanie się białka wzdłuż dynamicznie otwierającego i zamykającego się kanału transportowego plazmodesmy.

Wydaje się, że plazmodesmy w różnych tkankach mogą się różnić pod względem funkcji transportowych. Przekrój czynny pierwotnych plazmodesm młodych liści tytoniu nie ulega zwiększeniu pod wpływem białka typu MP wirusa mozaiki tytoniu [9,10]. Z kolei przekrój czynny plazmodesm w tkankach akceptorów asymilatów może być znacznie większy niż podstawowy [29,56], a przekrój czynny plazmodesm łączących komórki towarzyszące i rurki sitowe może wynosić nawet do 25 kDa [28]. Dzieje się tak zapewne pod wpływem niektórych białek syntetyzowanych w komórkach towarzyszących i przemieszczanych do rurek sitowych. Wiele białek występujących w rurekach sitowych wykazuje bowiem zdolność otwierania kanałów transportowych plazmodesm również w innych tkankach, np. w mezofilu [1,25]. W eksudatach floemu znaleziono też białka opiekuńcze [46]. Mogą one uczestniczyć w transporcie białek fibrylarnych o masie nawet do 96 kDa z komórek towarzyszących do rurek sitowych [22]. W drugą stronę usuwane są białka przeznaczone do degradacji. Zapewne mechanizm umożliwiający transport związków wielkocząsteczkowych przez plazmodesmy łączące komórki towarzyszące i rurki sitowe jest w pewien sposób unikatowy. Wynikać to może ze specjalizacji i charakteru współdziałania obu typów komórek.

#### 4. TRANSPORT RNA PRZEZ PLAZMODESMY

Podobnie jak białka, między komórkami może przemieszczać się RNA. Klasycznym tego przykładem jest inwazja wiroidów [12]. Są to cząstki kolistego RNA autonomicznie replikującego się w jądrze komórki roślinnej i następnie infekującego całą roślinę. Proces ten obejmuje przemieszczanie do wnętrza i na zewnątrz jądra, transport międzykomórkowy i dalsze rozprzestrzenianie się przez floem. Wydaje się, że w podobny sposób może być przemieszczane endogenne RNA. Przykładem jest występowanie mRNA nośnika sacharozy SUT1 w rurekach sitowych [30]. Białko to jest odpowiedzialne za symport sacharozy z apoplastu do wnętrza kompleksu komórki towarzyszące/rurki sitowe. U niektórych gatunków roślin białko to jest zlokalizowane głównie w plazmalemmie rurek sitowych. W rurekach sitowych lokalizuje się też jego mRNA, chociaż jego rola w tych komórkach nie jest jasna, bowiem nie zachodzi tam – jak się wydaje – biosynteza białek. Mechanizm międzykomórkowego transportu RNA nie jest poznany. Uważa się, że przemieszczanie RNA przez plazmodesmy jest umożliwiane przez wyspecjalizowane białka, działające jak białka opiekuńcze [59].

Sugerowane są różne funkcje RNA, który jest transportowany z komórki do komórki, bądź na większe odległości [11]. Wśród tych funkcji, najczęściej wymienia się zdalną regulację transkrypcji DNA oraz zależną od RNA postranskrypcyjną regulację ekspresji

genów. W pierwszym przypadku, jako przykład podaje się metylację DNA zależną od RNA [57]. RNA hybrydujący z określonym fragmentem DNA może wskazywać metylazie odpowiednią sekwencję DNA. W drugim, przykładem jest wyciszenie genów (ang. *gene silencing*) – związane z zależną od RNA degradacją nadmiarowego lub błędnego mRNA [32, 54]. Mechanizm taki jest zapewne włączony w obronę przeciw wirusom.

## 5. NADKOMÓRKOWY SYSTEM INFORMACJI I REGULACJI PROCESÓW FIZJOLOGICZNYCH W ROŚLINIE

Ostatnio pojawiły się hipotezy zakładające, że w roślinach oprócz znanych już hormonalnych czynników regulujących wzrost i rozwój, funkcje rośliny mogą być koordynowane przez inny system, w którym nośnikiem informacji między komórkami, tkankami, a nawet organami mogą być białka i kwasy nukleinowe [33,45]. Używając języka informatycznego, rolę bramek logicznych takiego systemu odgrywałyby plazmodesmy, natomiast floem pełniłby rolę szyny danych. System ten uczestniczyłby w koordynacji procesów wzrostu i rozwoju, a także w reakcji rośliny na stresy biotyczne i abiotyczne.

Znaleziono już niektóre elementy składowe proponowanego systemu regulacji. Wymiana związków sygnałowych, np. czynników transkrypcyjnych, może mieć istotne znaczenie dla różnicowania domen symplastycznych. Są to strefy komórkowe oddzielające się od innych symplastycznie [15]. Tworzenie domen symplastycznych może koordynować morfogenezę roślin, zarówno podczas rozwoju wegetatywnego jak i generatywnego [2,43].

Wiele białek ma zdolność nie tylko do zwiększania przekroju czynnego plazmodesm, ale może się także przemieszczać we floemie między organami. Przykładem jest endogenne białko CmPP16 z dyni [59]. Podobne własności jak białko CmPP16 mają tzw. P-proteiny występujące głównie u *Cucurbitae* [1,21], a także thioredoksyna h z ryżu biorąca udział w regulacji różnicowania się systemu przewodzącego we wczesnych stadiach rozwojowych oraz tworzenia aerenchymy w korzeniach w warunkach anaerobowych [25,26]. We floemie mogą się też przemieszczać białka endogenne, np. metalochaperon CCH, białko odpowiedzialne za mobilizację miedzi ze starzejących się liści *Arabidopsis* [37], a nawet egzogenne, takie jak białko GFP (ang. *green fluorescent protein*) [24]. Być może dalsze prace pozwolą znaleźć inne wielko-cząsteczkowe związki sygnałowe integrujące procesy w roślinie.



## 6. PODSUMOWANIE

Przedstawione tu koncepcje stanowią nową jakość w naszej wiedzy o roślinach. Nie tylko bowiem dostarczają nowych danych. Już na tym etapie mają dużą wartość praktyczną, związaną chociażby z wiedzą dotyczącą mechanizmów rozprzestrzeniania się wirusów i wiroidów w roślinie. Ostatnio zasugerowano również, że specyficzne substancje sygnałowe, białka bądź mRNA, syntetyzowane w komórkach floemu, mogą determinować tak ważną gospodarczo cechę jak karłowatość niektórych odmian jabłoni [3]. Przede wszystkim jednak nowe koncepcje dotyczące funkcjonowania plazmodesm, jako elementu nowopoznanego systemu sygnalizacji w roślinie opartego na makromolekułach, jako związkach sygnałowych, integrują informacje pochodzące z różnych dziedzin i poziomów badawczych. A w dobie coraz większej specjalizacji nauk szczegółowych jest to wartością samą w sobie.

## LITERATURA

- [1] BALACHANDRAN S, XIANG Y, SCHOBERT C, THOMPSON G, LUCAS WJ. Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 14150-14155.
- [2] BERGMANS ACJ, DE BOER AD, DERKSEN JWM, VAN DER SCHOOT C. The symplasmic coupling of  $L_2$ -cells diminishes in early floral development of *Iris*. *Planta*. 1997; **203**: 245-252.
- [3] BIĘLESKI RL. The bigger picture – phloem seen through horticultural eyes. *Aust J Plant Physiol* 2000; **27**: 615-624.
- [4] BLACKMAN LM, OVERALL RL. Immunolocalisation of the cytoskeleton to plasmodesmata of *Chara corallina*. *Plant J* 1998; **14**: 733-741.
- [5] BRET-HARTE MS, SILK WK. Fluxes and deposition rates of solutes in growing roots of *Zea mays*. *J Exp Bot* 1994; **45**: 1733-1742.
- [6] BOTHA CEJ. Plasmodesmatal distribution, structure and frequency in relation to assimilation in  $C_3$  and  $C_4$  grasses in southern Africa. *Planta* 1992; **187**: 348-358.
- [7] BOTHA CEJ, HARTLEY BJ, CROSS RHM. The ultrastructure and computer-enhanced digital image analysis of plasmodesmata at the Kranz mesophyll-bundle sheath interface of *Themeda triandra* var. *imberbis* (A) Camus in conventionally-fixed leaf blades. *Ann Bot* 1993; **72**: 255-261.
- [8] CARPENTER R, COEN ES. Transposon induced chimeras show that *floricauca*, a meristem identity gene, acts non-autonomously between cell layers. *Development* 1995; **121**: 237-248.
- [9] DEOM CM, SCHUBERT KR, WOLF S, HOLT C, LUCAS WJ, BEACHY RN. Molecular characterisation and biological function of the movement protein in tobacco mosaic virus in transgenic plants. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990; **87**: 3284-3288.
- [10] DING B, HAUDENSHIELD JS, HULL RJ, WOLF S, BEACHY RN, LUCAS WJ. Secondary plasmodesmata are specific sites of localisation of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* 1992; **4**: 915-928.
- [11] DING B, ITAYA A, WOO Y-M. Plasmodesmata and cell-to-cell communication in plants. *Int Rev Cyt* 1999; **190**: 251-316.
- [12] DING B, KWON MO, HAMMOND R, OWENS R. Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant J* 1997; **12**: 931-936.
- [13] DING B, LI Q-B, NGUYEN L, PALUKAITIS P, LUCAS WJ. Cucumber mosaic virus 3a protein potentiates cell-to-cell trafficking of CMV vRNA in tobacco plants. *Virology* 1995; **207**: 345-353.
- [14] DING B, TURGEON R, PARTHASARATHY MV. Substructure of freeze-substituted plasmodesmata. *Protoplasma* 1992; **169**: 28-41.

- [15] EHLERS K, BINDING H, KOLLMANN R. The formation of symplastic domains by plugging of plasmodesmata: a general event in plant morphogenesis? *Protoplasma* 1999; **209**: 181-192.
- [16] FUJIWARA T, GIESMAN-COOK MEYER D, DING B, LOMMEL SA, LUCAS WJ. Cell-to-cell trafficking of macromolecules through plasmodesmata potentiated by the red clover necrotic mosaic virus movement protein. *Plant Cell* 1993; **5**: 1783-1794.
- [17] GAMALEI YU. Structure and function of leaf minor veins in trees and herbs. A taxonomic review. *Trees* 1989; **3**: 96-110.
- [18] GAMALEI YU. Phloem loading and its development related to plant evolution from trees to herbs. *Trees* 1991; **5**: 50-64.
- [19] GAMALEI YU, VAN BEL AJE, PAKHOMOVA MV, SJUTKINA AV. Effects of temperature on the conformation of the endoplasmic reticulum and on starch accumulation in leaves with the symplastic minor-vein configuration. *Planta* 1994; **194**: 443-453.
- [20] GLOCKMANN C, KOLLMANN R. Structure and development of cell connections in the phloem of *Metasequoia glyptostroboides* needles. I. Ultrastructural aspects of modified primary plasmodesmata in Strasburger cells. *Protoplasma* 1996; **193**: 191-203.
- [21] GOLECKI B, SCHULZ A, CARSTENS-BEHRENS U, KOLLMANN R. Evidence for graft transmission of structural phloem proteins or their precursors in heterografts of *Cucurbitaceae*. *Planta* 1998; **206**: 630-640.
- [22] GOLECKI B, SCHULZ A, THOMPSON GA. Translocation of structural P proteins in the phloem. *Plant Cell* 1999; **11**: 127-140.
- [23] GRABSKI S, DE FEJTER AW, SCHNIDLER M. Endoplasmic reticulum forms a dynamic continuum for lipid diffusion between contiguous soybean root cells. *Plant Cell* 1993; **5**: 25-38.
- [24] IMLAU A, TRUERNIT E, SAUER N. Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* 1999; **11**: 309-322.
- [25] ISHIWATARI Y, FUJIWARA T, MCFARLAND KC, NEMOTO K, HAYASHI H, CHINO M, LUCAS WJ. Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* 1998; **205**: 12-22.
- [26] ISHIWATARI Y, NEMOTO K, FUJIWARA T, CHINO M, HAYASHI H. *In situ* hybridization study of the rice phloem thioredoxin h mRNA accumulation – possible involvement in the differentiation of vascular tissues. *Physiol Plant* 2000; **109**: 90-96.
- [27] JACKSON D, VEIT B, HAKE S. Expression of maize *KNOTTED1* related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development* 1994; **120**: 405-413.
- [28] KEMPERS R, VAN BEL AJE. Symplasmic connections between sieve element and companion cell in the stem phloem of *Vicia faba* L. have a molecular exclusion limit of at least 10 kDa. *Planta* 1997; **201**: 195-201.
- [29] KEMPERS R, PRIOR DAM, VAN BEL AJE, OPARKA KJ. Plasmodesmata between sieve element and companion cells of extrafascicular stem phloem of *Cucurbita maxima* permit passage of 3 kDa fluorescent probes. *Plant J* 1993; **4**: 567-575.
- [30] KÜHN C, FRANCESCHI VR, SCHULZ A, LEMOINE R, FROMMER WB. Molecular trafficking indicated by localisation and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* 1997; **275**: 1298-1300.
- [31] KWIATKOWSKA M. Autoradiographic studies on the role of plasmodesmata in the transport of gibberellin. *Planta* 1991; **183**: 294-299.
- [32] LINDBO JA, SILVA-ROSALES L, PROEBSTIG WM, DOUGHERTY WG. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 1993; **5**: 1749-1759.
- [33] LUCAS WJ. Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants. *Curr Opin Cell Biol* 1995; **7**: 673-680.
- [34] LUCAS WJ, DING B, VAN DER SCHOOT C. Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol* 1993; **125**: 435-476.
- [35] LUCAS WJ, WOLF S. Plasmodesmata: the intercellular organelle of green plants. *Trends in Cell Biol* 1993; **3**: 308-315.
- [36] MCLEAN BG, HEMPEL FD, ZAMBRYSKI PC. Plant intercellular communication via plasmodesmata. *Plant Cell* 1997; **9**: 1043-1054.

- [37] MIRA H, MARTINEZ-GARCIA F, PEÑARRUBIA L. Evidence for the plant-specific intercellular transport of the *Arabidopsis* copper chaperone CCH. *Plant J* 2001; **25**: 521-528.
- [38] NOUIERY AO, LUCAS WJ, GILBERTSON RL. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* 1994; **76**: 925-932.
- [39] PATRICK JW. Phloem unloading: sieve element and post-sieve element transport. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1997; **48**: 191-222.
- [40] PATRICK JW, OFFLER CE. Post-sieve element transport of photoassimilates in sink regions. *J Exp Bot* 1996; **47**: 1165-1177.
- [41] PERBAL M-C, HAUGHN G, SAEDLER H, SCHWARZ-SOMMER Z. Non-autonomous function of the *Anthirrhinum* floral homeotic proteins DEFFICIENS and GLOBOSA is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development* 1996; **122**: 3433-3441.
- [42] RADFORD JE, WHITE RG. Localisation of a myosin-like protein to plasmodesmata. *Plant J* 1998 **14**: 743-750.
- [43] RINNE PLH, VAN DER SCHOOT C. Symplasmic fields in the tunica of the shoot apical meristem coordinate morphogenetic events. *Development* 1998; **125**: 1477-1485.
- [44] ROBARDS AW, LUCAS WJ. Plasmodesmata. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1990; **41**: 369-419.
- [45] RUIZ-MEDRANO R, XOCONOSTLE-CÁZARES B, LUCAS WJ. The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 202-209.
- [46] SCHOBERT C, GROBMANN P, GOTTSCHALK M, KOMORE E, PECSEVARDI A, NIEDEN UZ. Sieve-tube exudate from *Ricinus communis* L. seedlings contains ubiquitin in chaperones. *Planta* 1995; **196**: 205-210.
- [47] SCHOBERT C, BAKER L, SZEDERKÉNYI J, GROBMANN P, KOMOR E, HAYASHI H, CHINO M, LUCAS WJ. Identification of immunologically related proteins in sieve-tubes exudate collected from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Planta* 1998; **206**: 245-252.
- [48] SCHULZ A. Plasmodesmal widening accompanies the short-term increase in symplasmic phloem unloading in pea root tips under osmotic stress. *Protoplasma* 1995; **188**: 22-37.
- [49] SINHA NR, WILLIAMS RE, HAKE S. Overexpression of the maize homeobox gene, *KNOTTED-1*, causes a switch from determinate to indeterminate cell fates. *Genes Dev* 1993; **7**: 787-795.
- [50] SOWIŃSKI P, RUDZIŃSKA-LANGWALD A, DALBIAK A, SOWIŃSKA A. Assimilate export from leaves of chilling-treated seedlings of maize. The path to vein. *Plant Physiol Biochem* 2001; **39**: 881-889.
- [51] TÓTH KF, SJÖLUND RD. Monoclonal antibodies against phloem P-protein from plant tissue cultures. II. Taxonomic distribution of cross-reactivity. *Am J Bot* 1994; **81**: 1378-1383.
- [52] TUCKER JE, MAUZERALL D, TUCKER EB. Symplastic transport of carboxyfluorescein in staminal hairs of *Setcreasea purpurea* is diffusive and includes loss to the vacuole. *Plant Physiol* 1989; **90**: 1143-1147.
- [53] TUCKER EB, TUCKER JE. Cell-to-cell diffusion in staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. *Protoplasma* 1993; **174**: 36-44.
- [54] VAN DEN BOOGAART T, LOMONOSSOFF GP, DAVIES JW. Can we explain RNA-mediated virus resistance by homology-dependent gene silencing? *Mol Plant Microbe Interact* 1998; **11**: 717-723.
- [55] WAIGMANN E, ZAMBRYSKI P. Tobacco mosaic virus movement protein mediated protein transport between trichome cells. *Plant Cell* 1995; **7**: 2069-2079.
- [56] WANG N, FISHER DB. The use of fluorescent tracers to characterize the post-phloem transport pathway in maternal tissues of developing wheat grains. *Plant Physiol* 1994; **104**: 17-27.
- [57] WASSENEGGER M, HEIMES S, RIEDEL L, SÄNGER HL. RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 1994; **76**: 567-576.
- [58] WOLF S, DEOM CM, BEACHY R, LUCAS WJ. Plasmodesmatal functions is robbed using transgenic tobacco plants that express a virus movement protein. *Plant Cell* 1991; **3**: 593-604.
- [59] XOCONOSTLE-CÁZARES B, XIANG Y, RUIZ-MEDRANO R, WANG H-L, MONZER J, YOO B-C, MCFARLAND KC, FRANCESCHI VR, LUCAS WJ. Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 1999; **283**: 94-98.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 30.01.2002 r.

Przyjęto: 08.05.2002 r.

Adres autora: Radzików, 05-870 Błonie,

e-mail: p.sowinski@ihar.edu.pl



## WPLYW MORFINY NA UKŁAD ODPORNOŚCIOWY KRĘGOWCÓW\*

THE EFFECT OF MORPHINE ON IMMUNITY OF VERTEBRATES

Magdalena CHADZIŃSKA

Zakład Immunobiologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński,  
Kraków

*Streszczenie:* Zainteresowanie wpływem narkotyków na działanie układu odpornościowego, ze specjalnym uwzględnieniem opiatów, wynika ze zwiększającej się obecnie liczby osób uzależnionych oraz pacjentów stosujących morfinę do uśmierzania bólu. Morfina działa rozmaicie na układ odpornościowy, hamując lub nasilając efektywność odpowiedzi. Opiaty mogą wpływać na układ odpornościowy bądź pośrednio wiążąc się z klasycznymi receptorami opioidowymi w centralnym systemie nerwowym, co powoduje zwiększone wydzielanie katecholamin i glikokortykosterydów, bądź mogą wiązać się bezpośrednio ze specyficznym receptorem opioidowym –  $\mu_3$  zlokalizowanym na leukocytach. Badania na uzależnionych od morfiny gryzoniach dowiodły, że w zahamowaniu aktywności cytotoksycznej komórek NK pośredniczą receptory opioidowe zlokalizowane w mózgu. Badania *in vitro* dotyczące głównie fagocytów potwierdzają natomiast teorię o bezpośrednim działaniu opiatów. Stwierdzono m.in., że inkubacja leukocytów z morfiną powoduje zahamowanie ich aktywności migracyjnej poprzez heterologiczne odwrażliwienie receptorów dla chemokin. Morfina obniża również aktywność żerną fagocytów, ale pobudza w nich wybuch tlenowy. Morfina wpływa także na odczyn zapalny. Podana wraz ze stymulantem do jamy otrzewnej obniża liczbę leukocytów i poziom czynników chemotaktycznych u myszy i ryb, ale nie u płazów i ptaków. Wykazano, że morfina upośledza także odpowiedź z udziałem limfocytów, gdyż hamuje ich aktywność proliferacyjną i produkcję przeciwciał.

*Słowa kluczowe:* morfina, receptory opioidowe, immunoneuroendokrynologia

*Summary:* Interest in the effects of drugs, especially opiates, on the immune system has increased with progression in the number of abusers and patients using morphine to relief pain. Morphine shows a diversity of effects on the immune system, inhibiting or enhancing the response. Opiates can alter a variety of immune responses either indirectly, via classical opioid receptors in CNS, what induces release of catecholamines and glucocorticosteroids or directly via selective –  $\mu_3$  opiate receptor localised on

\*Źródło finansowania: projekt badawczy KBN 6P04C04721 oraz DS/ZIE/IZ/UJ/2002.

leukocytes. Studies on morphine-dependent rodents demonstrated that suppressed NK-cell cytotoxicity was mediated by opiate receptors in the brain. *In vitro* studies on phagocytes confirm theory about the direct effects of opiates on these type of cells. For example incubation of leukocytes with morphine inhibits their migratory activity due to heterologous desensitization of chemokine receptors. Morphine reduces also phagocytic activity, but enhances the respiratory burst of phagocytes. Morphine also modulates inflammation; injected to peritoneal cavity together with an irritant reduced number of elicited leukocytes and the level of chemotactic factors in mice and fish, but not in amphibians and birds. Morphine also reduces lymphocyte-mediated immunity as it reduces proliferative response and production of antibodies.

*Key words:* morphine, opioid receptors, immunoneuroendocrinology

## 1. OPIOIDY I OPIATY

Określenie “opioide” jest nazwą rodzajową dla występujących naturalnie, półsyntetycznych i syntetycznych substancji, które działają poprzez receptory opioidowe. Endogennymi ligandami receptorów opioidowych są peptydy opioidowe, które dzieli się na trzy podstawowe grupy: endorfiny, enkefaliny i dynorfiny. Powstają one z trzech prekursorów: proopiomelanokortyny (POMC, 265 aminokwasów), proenkefaliny (PENK, 263 aminokwasów) i prodynorfiny (PDYN, 256 aminokwasów), w wyniku cięcia enzymatycznego przez enzymy z grupy metylopeptydaz zależnych od jonów cynku. Z proopiomelanokortyny w wyniku przemian potranslacyjnych powstają  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -endorfina, jak również peptydy nieopioide, m.in. hormon adreno-kortykotropowy (ACTH). Z proenkefaliny powstaje Leu- i Met-enkefalina, a z prodynorfiny – Leu-enkefalina, dynorfina A i B (rimorfina). Endogenne peptydy opioidowe syntetyzowane są głównie w przysadce, nadnerczach i obwodowym systemie nerwowym [55]. Wykazano również, że leukocyty mogą być źródłem opioidów [9, 54]. Stwierdzono między innymi, że podczas odczynu zapalnego w leukocytach gryzoni rośnie ekspresja mRNA dla jednego z prekursorów peptydów opioidowych – pro-enkefaliny [9, 54]

Występowanie peptydów opioidowych nie ogranicza się do ssaków. Z przysadki ryb kostnoszkieletowych wyizolowano dwie formy endorfin, natomiast z tkanek płazów otrzymano dwa peptydy opioide (dermorfinę i deltorfinę), a następnie sklonowano ich cDNA [45]. Związki te są wysoce selektywne odpowiednio dla receptorów opioidowych typu  $\delta$  i  $\mu$ . Interesujący jest fakt, że obydwa te związki w drugiej pozycji N-końcowej sekwencji zawierają aminokwas prawoskrętne (Tyr-D-Xaa-Phe), podczas gdy białka ssaków zbudowane są wyłącznie z aminokwasów lewoskrętnych (L-) [1, 45]. Również w tkankach bezkręgowców stwierdzono obecność prekursorów opioidów, m.in. cząsteczek podobnych do prodynorfiny [70].

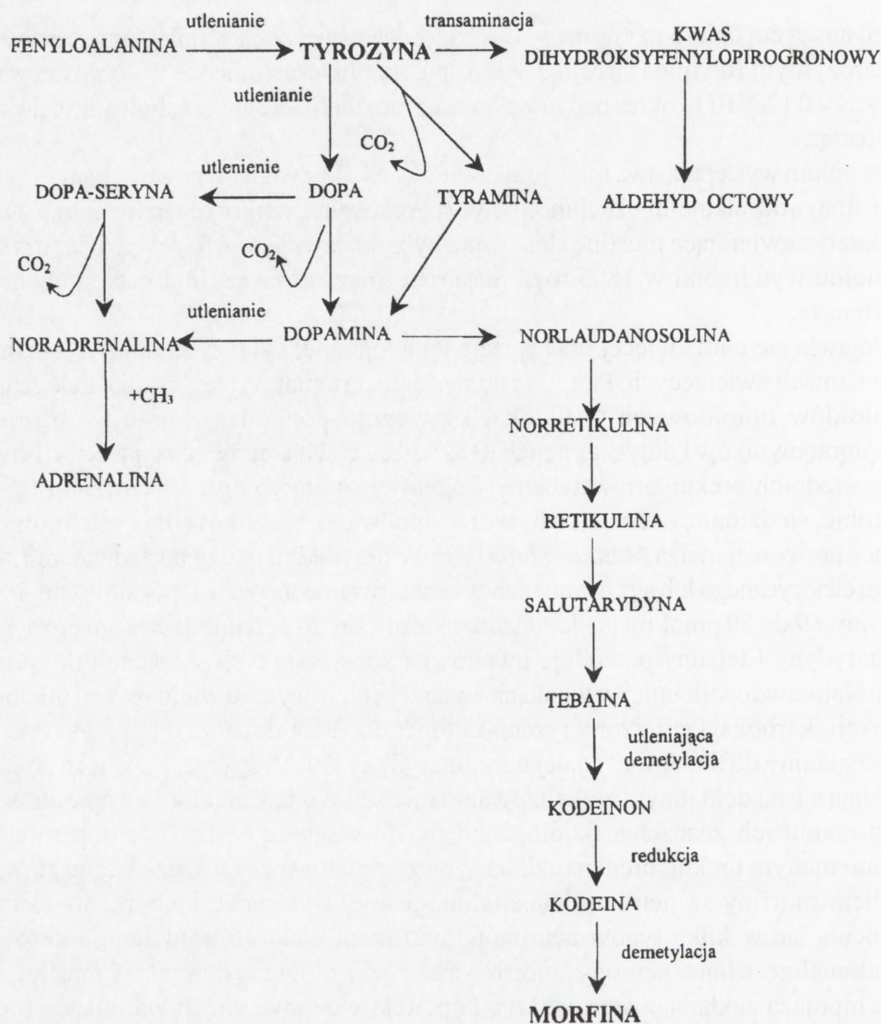
Z kolei nazwa “opiaty” zarezerwowana jest dla naturalnych substancji uzyskiwanych z maku lekarskiego (łac. *Papaverum somniferum* L., ang. *opium poppy*) oraz dla ich półsyntetycznych i syntetycznych pochodnych [13]. Nazwa opiaty wywodzi się od słowa opium, które oznacza substancję uzyskiwaną z wysuszonego soku mlecznego makówek. Wykopaliska archeologiczne z Egiptu i Babilonii wskazują, że już 4000 lat

przed naszą erą opium używane było jako środek uśmierzający ból. Opium znane było w starożytnym Rzymie i Grecji, a w Europie rozpowszechniło się w dobie renesansu. Wiek XVII i XVIII to okres badań wpływu opium na fizjologię i zachowanie człowieka i zwierząt.

W opium występują dwa rodzaje alkaloidów: alkaloidy fenatrenowe (tebaina, kodeina i morfina) oraz alkaloidy izochinolinowe (papaweryna, narkotyna, narceina). Choć preparaty zawierające morfinę stosowane były od dawna, morfinę w postaci czystego alkaloidu wyodrębnił w 1805 roku Sartürner i nazwał na cześć greckiego boga snu Morfeusza.

Pojawia się coraz więcej prac na temat endogennej syntezy kodeiny i morfiny w organizmach zwierzęcych. Pierwsze doniesienia na temat występowania endogennych alkaloidów opioidowych w tkankach zwierząt, pochodzą z prac S. Spectora i współpracowników i dotyczą ropuch [9, 67, 68, 71]. Następnie obecność morfiny i jej bezpośrednich prekursorów (tebainy, kodeiny i salutarydiny) stwierdzono m.in. w wątrobie, śledzionie, nadnerczach, skórze i podwzgórzu ssaków oraz w hemolimfie i tkance nerwowej małża *Mytilus edulis* [70]. W przypadku małży po zadziałaniu stresu szoku elektrycznego lub stresu unieruchomienia stwierdzono wzrost poziomu endogennej morfiny z 9 do 59 pmol/ml [71]. Ponadto okazało się, że podanie szczurom egzogennej salutarydiny i tebainy powoduje gwałtowną konwersję tych substancji do morfiny [70]. Najprawdopodobniej w tkankach zwierzęcych w wyniku wielu reakcji utleniania, redukcji, karboksylacji, izomeryzacji i odmetylowania dochodzi do przekształcenia fenyloalaniny do dopaminy i dalej do salutarydiny i morfiny (ryc. 1). Obecne badania skupiają się na dokładnym zlokalizowaniu miejsca syntezy alkaloidów opioidowych i wyjaśnieniu ich znaczenia fizjologicznego. Ze względu na fakt, że dopamina jest domniemanym prekursorem na szlaku syntezy opiatów przypuszcza się, że głównym źródłem morfiny są neurony katecholinergetyczne. Być może komórki macierzyste różnicują się w kilka typów neuronów, z których niektóre produkują adrenalinę i noradrenalinę, a inne (neurony „morfinoergiczne”) zdolne są do syntezy morfiny [70]. Inna hipoteza zakłada, że ten sam typ komórek w odpowiednich warunkach (np. po zadziałaniu stresora) równocześnie może syntetyzować katecholaminę i alkaloidy opioidowe [71].

Zarówno peptydy opioidowe, jak i morfina są agonistami receptorów opioidowych, a więc po ich połączeniu z receptorami opioidowymi dochodzi do uruchomienia kaskady sygnałowej. Znanych jest również wiele substancji wiążących się z receptorami opioidowymi, ale to związanie nie powoduje pobudzenia receptora, lecz jego zablokowanie, substancje takie nazywamy antagonistami i w przypadku receptorów opioidowych są to np. nalokson, naltrekson, naltrindol, czy CTOP [55]. Na rycinie 2 przedstawiono wzory niektórych alkaloidów i peptydów opioidowych.

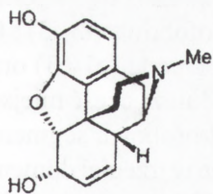


RYCINA. 1 Prawdopodobny szlak syntezy morfiny w tkankach zwierzęcych (według [71] zmodyfikowane)

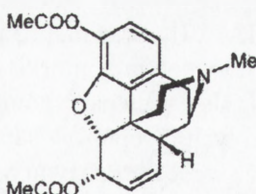
## 2. RECEPTORY OPIOIDOWE

Początkowo receptory opioidowe podzielono na 6 typów:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ,  $\epsilon$ ,  $\lambda$  i  $\sigma$ . Jednak badania biochemiczne i molekularne nie potwierdzają występowania receptorów typu  $\epsilon$ ,  $\lambda$ , natomiast zaliczanie receptora typu  $\sigma$  do receptorów opioidowych wydaje się kontrowersyjne ze względu na brak blokowania go przez nalokson [31]. Występowanie receptorów  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  zostało potwierdzone zarówno biochemicznie, jak i technikami molekularnymi – zostały sklonowane geny kodujące te receptory. Receptory  $\mu$  (65

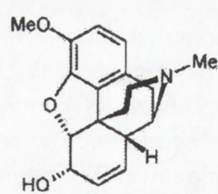




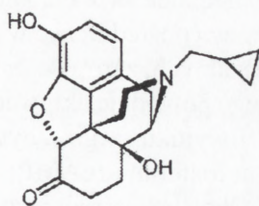
MORFINA



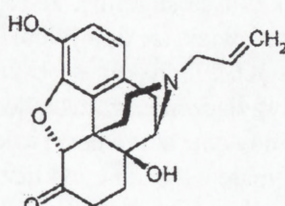
HEROINA



KODEINA



NALTREKSON



NALOKSON

Met-enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
Leu-enkefalina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
$\alpha$ -endorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr
$\beta$ -endorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu
$\gamma$ -endorfina	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu
dynorfina A	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln

RYCINA 2. Wzory alkaloidów (górna część rysunku) i peptydów opioidowych (dolna część rysunku)

kDa),  $\delta$  (53 kDa) i  $\kappa$  (55 i 35 kDa), ze względu na różną specyficzność i siłę wiązania naturalnych i syntetycznych opioidów podzielono jeszcze dodatkowo na podtypy (tab. 1). I tak na przykład receptory silnie wiążące [ $^3$ H]-dihydromorfinę i [ $^3$ H]-nalokson nazwano  $\mu_1$ , a receptor o słabym powinowactwie do tych związków to  $\mu_2$  [69]. Najogólniej rzecz biorąc peptydy pochodzące z proopiomelanokortyny (POMC) i z proenkefaliny (PENK) wykazują większe powinowactwo do receptorów  $\mu$  i  $\delta$  niż do receptora  $\kappa$ . Z kolei peptydy pochodzące z prodynorfiny (PDYN) wiążą się głównie z receptorem  $\kappa$ . Morfina wiąże się z wszystkimi typami receptorów opioidowych, wykazuje jednak do nich zróżnicowane powinowactwo ( $\mu_1 > \mu_2 > \mu_3 \cong \kappa_1 \cong \kappa_3 > \delta_1 > \kappa_2 \cong \delta_2$ ) [40].

Wszystkie receptory opioidowe mają bardzo podobną budowę. Składają się z siedmiu domen transbłonowych (TM I–TM VII), oraz mają 3 pętle hydrofobowe (i3-i3) i C-końcowy fragment skierowany do wnętrza komórki. Pozostałe 3 pętle (e1-e3) oraz glikozylowany N-końiec znajdują się na zewnątrz komórki. Zasadniczą część miejsca wiążącego ligandy w przypadku tych receptorów stanowią hydrofobowe segmenty transbłonowe. Wykazano m.in., że w receptorze typu  $\delta$  zastąpienie w trzeciej domenie transbłonowej (TM III) kwasu asparaginowego (Asp) w pozycji 128 przez asparaginę (Asn) drastycznie obniża siłę wiązanie agonistów o dużym powinowactwie [55]. Współczesne badania molekularne oraz fakt hamowania działania opioidów przez toksynę krztuśca sugerują, że receptory opioidowe sprzężone są z białkami  $G_i/G_o$ , chociaż pojawiają się doniesienia, że także białka  $G_s$  mogą pośredniczyć w działaniu opioidów [60]. Jednak w większości modeli doświadczalnych, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, przyłączenie agonisty do receptora opioidowego powoduje aktywację białka  $G_i$  i zahamowanie aktywności cyklazy adenylanowej, w wyniku czego w cytoplazmie komórki maleje stężenie cyklicznego adenosynomonofosforanu (cAMP). Opisano również wpływ opioidów na przemiany fosfoinozytoli. Obok bezpośredniego działania na wtórne przekazy, opioidy wpływają również na przewodnictwo jonowe. Sądzi się, że mogą hamować przewodnictwo  $Ca^{2+}$  oraz nasilać przewodnictwo  $K^+$  [55, 60].

Rozmieszczenie poszczególnych typów receptorów opioidowych w centralnym systemie nerwowym ma charakterystyczny wzór

TABELA 1. Selektywność receptorów opioidowych (wg [38] zmienione)

TYP RECEPTORA	LIGAND
$\mu$	$\mu_1$ Morfina, enkefaliny, demorfina $\mu_2$ Głównie morfina $\mu_3$ Tylko alkaloidy opioidowe (np. morfina)
$\delta$	$\delta_1$ Enkefaliny, deltorfina $\delta_2$ Met-enkefalina
$\kappa$	Dynorfiny i Ketocyklozocyna

zależny od struktury mózgu i od gatunku zwierzęcia (np. mózg szczura zawiera niewielką ilość receptorów  $\kappa$ , natomiast w mózgu świnki morskiej znajduje się ich bardzo dużo). Receptory opioidowe znajdują się w kilku obszarach centralnego systemu nerwowego, w szczególności w substancji szarej okołowodociągowej oraz w rdzeniu kręgowym

[55]. Typy i podtypy receptorów opioidowych różnią się również funkcją. I tak na przykład w działaniu przeciwbólowym opioidów pośredniczą na poziomie rdzeniowym receptory  $\mu_2$ ,  $\delta_2$  i  $\kappa_1$ , a na poziomie nadrdzeniowym receptory  $\mu_1$ ,  $\kappa_3$  i  $\delta$  (najprawdopodobniej  $\delta_1$  i  $\delta_2$ ). Receptor  $\mu_2$  ma głównie znaczenie w indukowanej przez alkaloidy depresji oddychania, polegającej na zmniejszeniu wrażliwości ośrodka oddechowego na zawartość dwutlenku węgla we krwi [40]. Specyficzne receptory opioidowe opisano także w centralnym systemie nerwowym kręgowców zmiennościplnych [6]. Stwierdzono również występowanie receptorów opioidowych

na komórkach obwodowego układu nerwowego [72], czym tłumaczono przeciwbólowy efekt bardzo niskich dawek morfiny podanych miejscowo do uszkodzonych tkanek [13].

### 3. OPIOIDY A UKŁAD ODPORNOŚCIOWY

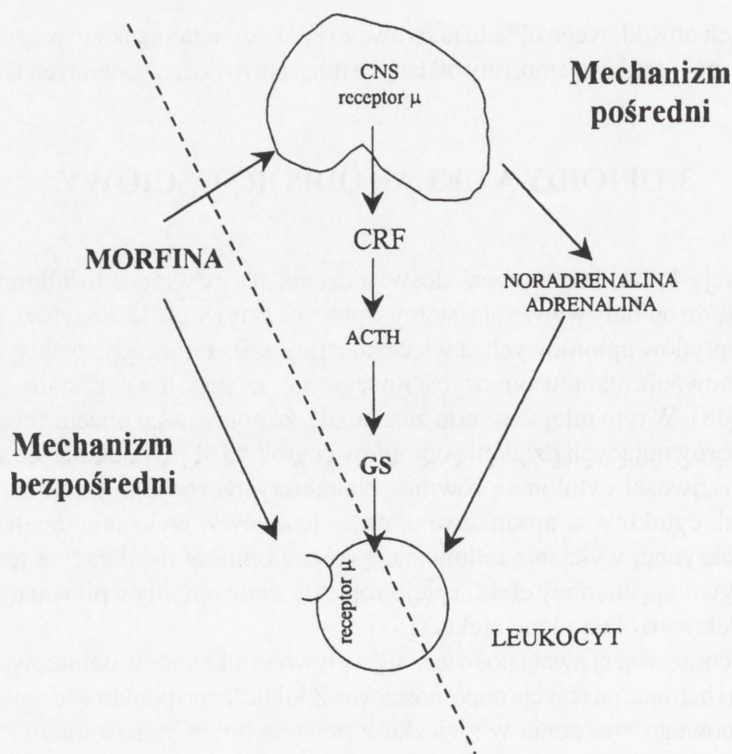
Obserwacje ludzi, jak również doświadczenia na zwierzętach laboratoryjnych potwierdzają, że opioidy wywierają istotny wpływ na aktywność leukocytów. Wszystkie trzy typy peptydów opioidowych, a więc endorfiny, enkefaliny i dynorfiny, wpływają na funkcjonowanie układu odpornościowego, co szczegółowo zostało opisane w literaturze [48]. W tym miejscu warto zaznaczyć, że pojawia się obecnie coraz więcej doniesień porównujących działanie opioidów i cytokin [51]. Wskazuje się na fakt, że główne właściwości cytokin są również charakterystyczne dla opioidów. Opioidy podobnie jak cytokiny są produkowane przez leukocyty, wykazują działanie para-, auto- i endokrynne, wykazują redundancję (różne opioidy działając na ten sam typ komórek wywołują podobny efekt) i plejotropię (te same opioidy wpływające na różne typy komórek wywołują różne efekty) [51].

Obecnie coraz więcej uwagi poświęca się wpływowi alkaloidów opioidowych, takich jak: morfina i heroina, na reakcje odpornościowe. Z klinicznego punktu widzenia zjawisko to nabiera nowego znaczenia w związku z powszechnym stosowaniem morfiny w leczeniu silnego i umiarkowanego bólu nowotworowego oraz tzw. ostrego bólu nienawracającego, spowodowanego przez stany zapalne będące konsekwencją na przykład oparzeń, urazów czy operacji chirurgicznych [13], a także w związku z obserwacjami o większej podatności na infekcje u osób uzależnionych od narkotyków [44]. W tym kontekście ważne wydają się doniesienia na temat podwyższonej ekspresji wirusa HIV w leukocytach *in vitro* inkubowanych z opiatami [2, 27, 51, 57].

#### 3.1. Mechanizmy wpływu morfiny na układ odpornościowy

Obecnie postuluje się dwa główne mechanizmy wpływu morfiny na układ odpornościowy: pośredni i bezpośredni (ryc. 3).

Doświadczenia przeprowadzane na gryzoniach uzależnionych od morfiny wskazują, że pierwotnym miejscem działania tego alkaloidu jest centralny system nerwowy i dopiero to on wtórnie działa na układ odpornościowy [52, 58]. Morfina wiążąc się z klasycznymi receptorami opioidowymi w centralnym systemie nerwowym powoduje wydzielanie katecholamin – adrenaliny i noradrenaliny [30]. Katecholaminy wiążą się z powierzchniowymi receptorami  $\alpha$ - i  $\beta$ -adrenergicznymi. Połączenie adrenoreceptora z odpowiednim ligandem uruchamia szlak przemiany fosfoinozytoli, powoduje wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu wapnia. Receptory typu  $\alpha$  połączone są z białkiem typu  $G_i$ , a zatem ich aktywacja powoduje spadek poziomu cAMP, z kolei  $\beta$ -adrenoreceptory są związane z białkami  $G_s$  i ich stymulacja powoduje wzrost cAMP w komórce [30]. W tym miejscu trzeba zaznaczyć, że zarówno centralne, jak i wtórne



RYCINA 3. Wpływ morfiny na leukocyty kręgowców. CNS – centralny system nerwowy, CRF – kortykoliberyna, ACTH – hormon adrenokortykotropowy, GS – glikokortykosterydy (według [52] zmodyfikowane)

narządy limfatyczne są unerwiane właśnie przez adrenergiczne włókna układu współczulnego [16, 20, 30], oraz że na powierzchni leukocytów krwi człowieka [23, 77], splenocytów i tymocytów myszy [23], a także leukocytów ryb i płazów [34] stwierdzono obecność receptorów  $\beta$ -adrenergicznych.

Morfina działając na receptory opioidowe zlokalizowane w mózgu może również powodować uruchomienie osi stresu: podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA). Podwzgórze uwalnia kortykoliberynę (CRF), która stymuluje wydzielanie z przysadki hormonu adrenokortykotropowego (ACTH), odpowiedzialnego za pobudzenie syntezy glikokortykosterydów przez nadnercza [53]. Glikokortykosterydy wiążą się ze swoistym receptorem cytoplazmatycznym, który po aktywacji przemieszcza się do jądra komórkowego. Cytoplazmatyczne receptory dla glikokortykosterydów znaleziono niemal we wszystkich komórkach organizmu, są one również obecne w leukocytach [37]. Glikokortykosterydy działają z reguły hamująco na funkcjonowanie układu odpornościowego, co jest zjawiskiem ogólnobiologicznym, stwierdzono je bowiem u przedstawicieli wszystkich gromad kręgowców [53].

Danych potwierdzających tezę o działaniu morfiny na układ odpornościowy za pośrednictwem klasycznych receptorów opioidowych zlokalizowanych w centralnym systemie nerwowym dostarczyły prace zespołu Y. Shavita [61–63], pokazujące zahamowanie aktywności komórek NK (*natural killers*) u szczurów, którym podawano morfinę. Do obniżenia aktywności komórek NK dochodziło po podaniu morfiny zarówno do bocznej komory mózgu, jak i pod skórę. Reakcja ta była odwracana przez podanie antagonisty receptorów opioidowych – naltreksonu. Zjawiska zahamowania aktywności komórek NK nie obserwowano natomiast po podaniu N-metylomorfiny – analogu morfiny nieprzenikającego przez barierę krew-mózg [61]. Stwierdzono, że morfina egzogenna, wiążąc się z klasycznymi receptorami opioidowymi w mózgu aktywuje oś HPA i powoduje wzrost stężenia kortykosterydów i katecholamin w surowicy [52, 58]. W późniejszych badaniach stwierdzono ponadto, że chroniczne działanie morfiny powoduje u myszy atrofię narządów limfatycznych, śledziony i grasicy. Przejściowo, najprawdopodobniej na skutek wzmożonej apoptozy, ubywa w grasicy limfocytów CD4+CD8+. Zjawisko to jest odwracane przez antagonistów receptorów opioidowych i antagonistów receptorów dla glikokortykosterydów [52, 58]. Zaobserwowano również, że usunięcie przysadki, nadnerczy, jak również podanie antagonistów steroidowych (np. RU 38486), znosi w pewnych układach eksperymentalnych wpływ morfiny na układ odpornościowy [17, 32].

Mechanizmy działania morfiny na układ odpornościowy różnią się w zależności od sposobu jej podania. Obecnie wskazuje się, że najprawdopodobniej morfina podana jednorazowo powoduje zwiększone wydzielanie katecholamin i mamy tutaj do czynienia z immunosupresją niezależną od kortykosterydów. Natomiast chroniczne podawanie tego alkaloidu powoduje aktywację osi podwzgórze-przysadka- nadnercza i zwiększone wydzielanie „hormonów stresu” [44].

Morfina może jednak działać również bezpośrednio na komórki układu odpornościowego poprzez receptory opioidowe zlokalizowane na leukocytach.

Dowody na obecność receptorów opioidowych na leukocytach pochodzą głównie z doświadczeń *in vitro*. Najwcześniejsze doniesienia na ten temat zostały opublikowane przez J. Wybrana [78]. Zaobserwowano wówczas, że godzinna inkubacja limfocytów T z morfiną obniża ich zdolność do tworzenia rozet z erytrocytami owcy (SRBC, *ang. sheep red blood cells*), co wskazywało na zmiany w ekspresji receptorów powierzchniowych (jak teraz wiadomo receptorów CD2). Efekt morfiny był odwracany przez antagonistę receptorów opioidowych – nalokson [17]. Metody wiązania radioligandów pozwoliły na wykrycie receptorów opioidowych na powierzchni limfocytów T i B [58, 60], limfocytów śledzionowych ssaków, granulocytów, monocytów i makrofagów [40, 59] oraz na leukocytach kręgowców zmiennocieplnych [7, 33], a także na fagocytach bezkręgowców [71]. Także na poziomie mRNA stwierdzono w leukocytach ekspresję genów kodujących receptory opioidowe. Geveriaux ze współpracownikami [24] wykryli mRNA dla receptorów opioidowych typu  $\kappa$ , ale nie dla receptorów typu  $\delta$ , w limfocytach i monocytach krwi obwodowej człowieka. Transkrypty dla receptorów  $\delta$  były natomiast obecne w liniach komórkowych

limfocytów T i B oraz w leukocytach myszy i małp [24]. Obecność matrycowego RNA dla receptorów  $\mu$  stwierdzono też w makrofagach ludzi, małp i szczurów, w ludzkich neutrofilach, limfocytach CD4<sup>+</sup> oraz w komórkach linii limfocytarnych CEM x 174 T/B i Raji B [73].

Dodatkowo sugeruje się istnienie na leukocytach szczególnych typów receptorów opioidowych. Na przykład na powierzchni leukocytów myszy znaleziono nietypowy receptor o nanomolarnym powinowactwie do <sup>125</sup>I- $\beta$ -endorfiny ( $K_d=12$  nM). Okazało się, że receptor ten wiąże C-końcowy fragment  $\beta$ -endorfiny o sekwencji H-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Leu-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Gly-Glu-OH, podczas gdy klasyczne receptory  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$  wiążą N-końcowe fragmenty peptydów opioidowych [71]. Obecność tego typu receptorów wykazano na komórkach linii limfocytarnej U937 oraz na leukocytach śledziony. Co ciekawe, ekspresja tych receptorów na leukocytach zwiększa się po aktywacji komórek np. pod wpływem konkanawaliny A [48]. Sugeruje się, że ten typ receptorów pośredniczy we wpływie  $\beta$ -endorfiny na proliferację komórek mono-nuklearnych, produkcję interleukiny-2 i na wychwyt wapnia [60]. Zaliczenie jednak tego receptora w poczet receptorów opioidowych poddawane jest w wątpliwość w związku z jego kompletnym brakiem wrażliwości na nalokson (nawet w stężeniu 100 mM).

Inny typ „szczególnego” receptora opioidowego występującego na powierzchni leukocytów to receptor  $\mu_3$ . Receptor ten wykazuje bardzo niskie powinowactwo do peptydów opioidowych, wiąże natomiast specyficznie morfinę ( $K_d=20-70$  nM), podczas gdy klasyczne receptory opioidowe wykazują raczej niskie powinowactwo do tego alkaloidu [58]. Funkcję fizjologicznego ligandu tego receptora spełnia być może morfina syntetyzowana endogennie [71]. Obecność receptora opioidowego  $\mu_3$  stwierdzono między innymi na powierzchni ludzkich granulocytów [41] i monocytów [71], na makrofagach linii komórkowych J774.2, BAC1.2F-5, RAW 264 [40, 42], na leukocytach karasia [7, 33], a także na fagocytach małża *Mytilus edulis* [71]. Co ciekawe w centralnym systemie nerwowym obecność tego typu receptora opioidowego stwierdzono głównie na powierzchni astrocytów i mikrogleju, a więc na komórkach z rodziny fagocytów jednojądrzastych [71]. Warto w tym miejscu zaznaczyć występowanie silnych powiązań pomiędzy aktywacją receptora  $\mu_3$  i wzmożoną produkcją tlenu azotu przez komórki. Sugeruje się, że zdolność komórek mikrogleju do produkcji NO w odpowiedzi na opiaty może być ważna zarówno z uwagi na cytotoksyczne właściwości tlenu azotu, jak również z uwagi na jego funkcję jako neuroprzekaznika [69, 71].

Hipotezę o bezpośrednim wpływie morfiny na leukocyty potwierdzają badania *in vitro*. Stwierdzono między innymi, że inkubacja komórek mikrogleju świń z morfiną powoduje prawie całkowite zahamowanie fagocytozy grzybów *Cryptococcus neoformans*. Stwierdzono, że zjawisko to ma charakter receptorowy i połączenie morfiny z receptorem  $\mu$  powoduje aktywację białek G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> [66]. W opozycji do tej obserwacji pozostają wyniki, w których wykazano nasilenie fagocytozy *Mycobacterium tuberculosis* przez inkubowane z morfiną komórki mikrogleju człowieka [50]. Te same

komórki wykazują natomiast w obecności morfiny zahamowanie migracji w kierunku czynnika C5a dopełniacza [11].

### 3.1.1. Wpływ morfiny na fagocyty

Wspomniano już wcześniej, że morfina zmienia aktywność fagocytarną komórek mikrogleju, będących w mózgu odpowiednikiem makrofagów. Okazuje się również, że morfina podana zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* hamuje fagocytozę w makrofagach i neutrofilach [17, 19, 25, 26, 75]. Stwierdzono również zahamowanie migracji tych komórek w kierunku różnych chemoatraktantów (IL-8, MIP-1 $\beta$ , RANTES) [14, 28, 29]. Autorzy wymienionych prac sądzą, że zahamowanie to jest wynikiem heterologicznego odwrócenia receptora dla chemokin, wywołanego przez aktywację receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\delta$ . Najogólniej zjawisko heterologicznego odwrócenia receptora polega na tym, że odpowiedź z udziałem określonego typu receptora modyfikowana jest przez bodźce działające za pośrednictwem innych układów receptorowych. W opisywanym tutaj przypadku w wyniku połączenia receptorów opioidowych z morfiną dochodzi do aktywacji białka G $_i$ , a następnie do fosforylacji receptora dla chemokin, co osłabia wydajność przekazywania tego układu receptorowego [14, 28, 29]. Również inne własności fagocytów są modulowane przez morfinę. Po inkubacji *in vitro* z morfiną obserwowano zahamowanie produkcji wolnych rodników tlenowych w stymulowanych konkanawaliną A i PMA monocytach i neutrofilach krwi ochotników [17, 76]. Z drugiej strony stwierdzono podwyższony wybuch tlenowy u myszy *in vivo* potraktowanych morfiną [8, 15]. Morfina podana podskórnie powodowała podniesienie produkcji tlenu azotu w makrofagach myszy i neutrofilach ludzi [17, 76]. Równocześnie I.D. Welters i współpracownicy [76] zaobserwowali, że morfina powodowała obniżenie ekspresji receptorów dla składników dopełniacza i fragmentu Fc przeciwciał typu IgG (Fc $\gamma$ R) na neutrofilach. Wszystkie powyższe zmiany w aktywności neutrofilii, spowodowane inkubacją z morfiną, były znoszone przez wcześniejszą inkubację komórek z inhibitorem syntazy NO. Sugeruje to, że morfina pobudza komórki do produkcji tlenu azotu, a zaobserwowane zmiany w ich aktywności są już konsekwencją podniesionego poziomu NO. Wysoka synteza NO w makrofagach potraktowanych morfiną jest również przyczyną ich podwyższonej apoptozy, na skutek zmian w poziomie białek Bax i p53 [64, 65].

Morfina wpływa także na syntezę wielu cytokin. W warunkach *in vitro* powoduje m.in. zahamowanie produkcji TNF- $\alpha$  i IL-1 w makrofagach równocześnie stymulowanych LPS lub PHA [3, 12]. Co ciekawe, jeżeli inkubacja leukocytów z morfiną poprzedza ich stymulację, dochodzi wówczas do podwyższonej produkcji cytokin [49, 71].

Oczywiście zjawisko wpływu morfiny na zahamowanie aktywności leukocytów związane jest ściśle z wpływem na odczyn zapalny [8, 10, 36, 38, 56]. Stwierdzono m.in., że podanie morfiny obniża liczbę leukocytów w ognisku zapalenia, zarówno u ryb [7, 8, 10] jak i gryzoni [8, 17] oraz królików [17]. Nie jest to jednak zjawisko powszechne w świecie zwierząt, bowiem nie zaobserwowano go ani u płazów [35], ani u ptaków [39]. Obniżenie liczby leukocytów w miejscu zapalenia po podaniu morfiny

wynikać może z kilku przyczyn; morfina docierając do leukocytów w naczyniach i tkance hemopoetycznej może hamować ich migrację do ogniska zapalenia. Do zahamowania migracji dojść może w wyniku wspomnianego już wcześniej, zależnego od morfiny, heterologicznego odwracliwienia receptorów dla chemokin [28, 29]. Morfina może również wpływać na znajdujące się w ognisku zapalenia komórki osiadłe (makrofagi i komórki tuczne) i hamować syntezę i/lub wydzielanie przez nie czynników o charakterze chemotaktycznym. Hipotezę tę potwierdza znaczne obniżenie poziomu czynników chemotaktycznych w osoczu i płynie wysiękowym osobników, którym lokalnie podano morfinę do ogniska zapalenia [8, 10]. Stwierdzono ponadto, że morfina, za pośrednictwem obecnych na śródbłonku receptorów  $\mu_3$ , indukuje produkcję tlenu azotu, co pociąga za sobą obniżenie poziomu białek adhezyjnych i zmniejszenie migracji leukocytów do miejsca zapalenia [47].

### 3.1.2. Wpływ morfiny na komórki NK

Pierwsze doniesienia na temat wpływu morfiny na aktywność komórek NK pochodzą z prac zespołu Shavita [61, 62]. Wspomniano już o nich przy omawianiu pośredniego mechanizmu działania morfiny. Późniejsze badania przeprowadzone na ochotnikach, którym dożylnie podano morfinę, potwierdziły wcześniejsze obserwacje o obniżonej aktywności cytotoksycznej tych komórek w obecności opiatów [79]. Podobne zjawisko obniżenia czy nawet całkowitego zahamowania aktywności komórek NK pod wpływem morfiny zaobserwowano również w przypadku gryzoni i małp [19]. Tylko jedna praca donosi o bezpośrednim hamującym wpływie morfiny na komórki NK [43], pozostali autorzy zajmujący się tym tematem podkreślają, że w przypadku wpływu opioidów na komórki NK mamy do czynienia z działaniem za pośrednictwem współczulnego układu nerwowego i osi HPA. Wykazano bowiem, że antagoniści receptorów  $\beta$ -adrenergicznych i glikokortykosterydowych znoszą hamujący wpływ morfiny oraz nie stwierdzono zmian w aktywności komórek NK po podaniu analogów morfiny nie przekraczających bariery krew-mózg [19].

### 3.1.2. Wpływ morfiny na limfocyty

Pierwsze doniesienia na temat wpływu morfiny na aktywność limfocytów B pochodzą z 1975 roku [19]. S.S. Lefkowitz i C.Y. Chiang zaobserwowali wówczas, że podanie morfiny redukuje liczbę komórek produkujących przeciwciała w śledzionach myszy po podaniu erytrocytów owcy (SRBC). Zjawisko to zostało potwierdzone w badaniach *in vitro* [18]. Późniejsze badania wykazały ponadto wpływ morfiny na obniżenie proliferacji limfocytów B stymulowanych LPS [19, 74]. Pod wpływem morfiny dochodzi również do obniżenia proliferacji limfocytów T stymulowanych mitogenami [4, 18], zahamowania ich aktywności cytotoksycznej i zmniejszenia produkcji IL-2 [46]. Badania wykorzystujące opioidy nie przenikające przez barierę krew-mózg wskazują, że wpływ morfiny na limfocyty T odbywa się za pośrednictwem receptorów opioidowych znajdujących się w centralnym systemie nerwowym [21, 22]. Potwierdza to wiele badań, w których nie stwierdzono bezpośredniego (*in vitro*) wpływu morfiny na aktywność limfocytów T [17, 21, 22]. Wyniki te pozostają w sprzeczności z



pionierskimi badaniami J. Wybrana [78] oraz z faktem występowania na limfocytach T specyficznych receptorów opioidowych wiążących nalokson [19].

#### 4. PODSUMOWANIE

Badania *in vivo*, przeprowadzane głównie na gryzoniach, pozwoliły stwierdzić, że w większości układów eksperymentalnych morfina wywiera hamujący wpływ na aktywność komórek NK, limfocytów T i B oraz fagocytów (tab. 2).

Bezpośredni efekt morfiny nie pozostawia jednak wątpliwości tylko w przypadku funkcji fagocytów. W odniesieniu do pozostałych typów leukocytów hamujący wpływ morfiny najprawdopodobniej zachodzi przy udziale klasycznych receptorów opioidowych zlokalizowanych w centralnym systemie nerwowym i jest konsekwencją podniesienie poziomu katecholamin (w przypadku ostrego podania morfiny) lub kortykosterydów (w przypadku chronicznego podawania opiatów). W tym miejscu warto zaznaczyć, że sprzeczne wyniki dotyczące wpływu morfiny na odporność wynikać mogą z różnej wrażliwości zwierząt laboratoryjnych na opioidy. A wrażliwość ta zależy nie tylko od dawki i sposobu podania, ale również od gatunku, szczepu, płci i stanu fizjologicznego osobników, na których wykonywane są doświadczenia.

Dokładne wyjaśnienie powiązań między układem odpornościowym a opioidowym wymagać będzie jeszcze wielu lat wyteżonej pracy.

#### PODZIĘKOWANIE

Bardzo dziękuję Pani Prof. dr hab. Barbarze Płytycz oraz Dr Szczepanowi Józefowskiemu za dyskusję i cenne uwagi.

#### LITERATURA

- [1] AMICHE M, DELFOUR A, NICOLAS P. Opioid peptides from frog skin. *Exs* 1998; **85**: 57-71.
- [2] BALDWIN GC, ROTH MD, TASHKIN DP. Acute and chronic effects of cocaine on the immune system and the possible link to AIDS. *J Neuroimmunol* 1998; **83**: 133-138.
- [3] BIAN TH, WANG XF, LI XY. Effect of morphine on interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha production from mouse peritoneal macrophages *in vitro*. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1995; **16**: 449-451.
- [4] BIAN TH, WANG XF, LI XY. Effects of morphine and naloxone on proliferation of lymphocytes *in vitro*. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1995; **16**: 315-318.
- [5] BIANCHI M, PANERAI AE. Naloxone-induced analgesia: involvement of kappa-opiate receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; **46**: 145-148.
- [6] BROOKS AI, STANDIFER KM, CHENG J, CISZEWSKA G, PASTERNAK GW. Opioid binding in giant toad and goldfish brain. *Receptor* 1994; **4**: 55-62.

TABELA 2. Przykłady wpływu morfiny na aktywność leukocytów ssaków (MF – makrofagi, Mo – monocyty, MG – mikroglej, PMN – neutrofile, Li – limfocyty) ↑ – pobudzający, ↓ – hamujący

Typ komórki	Gatunek	Traktowanie	Efekt	Literatura
Fagocytoza				
MF	Mysz	<i>In vivo</i>	↓	19
		<i>In vitro</i>	↓	75
	Szczur	<i>In vivo</i>	↓	25, 26
MG	Świnia	<i>In vitro</i>	↓	66
	Człowiek	<i>In vitro</i>	↑	50
Chemotaksja				
Mo	Małpa	<i>In vitro</i>	↓	14
	Człowiek	<i>In vitro</i>	↓	28, 29
MG	Człowiek	<i>In vitro</i>	↓	11
PMN	Małpa	<i>In vitro</i>	↓	14
Wybuch tlenowy				
Mo	Człowiek	<i>In vitro</i>	↓	17
PMN	Człowiek	<i>In vitro</i>	↓	76
	Mysz	<i>In vivo</i>	↑	8, 15
Produkcja tenku azotu				
MF	Mysz	<i>In vivo</i>	↑	17
PMN	Człowiek	<i>In vivo</i>	↑	76
Produkcja cytokin prozapalnych				
MF	Mysz	<i>In vitro</i>	↓	3
Mo	Człowiek	<i>In vitro</i>	↓	12

TABELA 2 cd.

Typ komórki	Gatunek	Traktowanie	Efekt	Literatura
Produkcja IFN- $\gamma$				
MF	Mysz	<i>In vivo</i>	↓	17
	Szczur	<i>In vivo</i>	↓	22
	Człowiek	<i>In vitro</i>	↓	51
Cytotoksyczność				
NK	Mysz	<i>In vivo</i>	↓	17
	Szczur	<i>In vivo</i>	↓	21, 61, 62
	Człowiek	<i>In vivo</i>	↓	79
Produkcja przeciwciał				
Li B	Mysz	<i>In vivo</i>	↓	17, 18
		<i>In vitro</i>	↓	17, 18
Proliferacja				
Li B	Mysz	<i>In vitro</i>	↓	4, 17, 18, 74
	Szczur	<i>In vivo</i>	↓	17
Li T	Mysz	<i>In vitro</i>	↓	4
		<i>In vivo</i>	↓	18
	Szczur	<i>In vivo</i>	↓	32

- [7] CHADZINSKA M, JOZEFOWSKI S, BIGAJ J, PLYTYCZ B. Morphine modulation of thioglycollate-elicited peritoneal inflammation in the goldfish, *Carassius auratus*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1997; **45**: 321-327.
- [8] CHADZINSKA M, KOLACZKOWSKA E, SELJELID R, PLYTYCZ B. Morphine modulation of peritoneal inflammation in Atlantic salmon and CB6 mice. *J Leukoc Biol* 1999; **65**: 590-596.
- [9] CHADZINSKA M, MAJ M, SCISLOWSKA-CZARNECKA A, PRZEWLOCKA B, PLYTYCZ B. Expression of proenkephalin (PENK) mRNA in inflammatory leukocytes during experimental peritonitis in Swiss mice. *Pol J Pharmacol* 2001; **53**: 715-718.
- [10] CHADZINSKA M, SCISLOWSKA-CZARNECKA A, PLYTYCZ B. Inhibitory effects of morphine on some inflammation-related parameters in the goldfish *Carassius auratus* L. *Fish Shellfish Immunol* 2000; **10**: 531-542.
- [11] CHAO CC, HU S, SHARK KB, SHENG WS, GEKKER G, PETERSON PK. Activation of mu-opioid receptors inhibits microglial cell chemotaxis. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **281**: 998-1004.
- [12] CHAO CC, MOLITOR TW, CLOSE K, HU S, PETERSON PK. Morphine inhibits the release of tumor necrosis factor in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Int J Immunopharmacol* 1993; **15**: 447-453.
- [13] CHERNY NI. Opioid analgesics: comparative features and prescribing guidelines. *Drugs* 1996; **51**: 713-737.
- [14] CHOI Y, CHUANG LF, LAM KM, KUNG HF, WANG JM, OSBURN BI, CHUANG RY. Inhibition of chemokine-induced chemotaxis of monkey leukocytes by mu-opioid receptor agonists. *In Vivo* 1999; **13**: 389-396.
- [15] DI FRANCESCO P, TAVAZZI B, GAZIANO R, LAZZARINO G, CASALINUOVO IA, DI PIERRO D, GARACI E. Differential effects of acute morphine administrations on polymorphonuclear cell metabolism in various mouse strains. *Life Sci* 1998; **63**: 2167-2174.
- [16] DOWNING JE, MIYAN JA. Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunol Today* 2000; **21**: 281-289.
- [17] EISENSTEIN TK, HILBURGER ME. Opioid modulation of immune responses: effects on phagocyte and lymphoid cell populations. *J Neuroimmunol* 1998; **83**: 36-44.
- [18] EISENSTEIN TK, MEISSLER JJ, JR., BUSSIÈRE JL, ROGERS TJ, GELLER EB, ADLER MW. Mouse strain differences in *in vivo* and *in vitro* immunosuppressive effects of opioids. *Adv Exp Med Biol* 1995; **373**: 115-121.
- [19] EISENSTEIN TK, ROGERS TJ, MEISSLER JJ, JR., ADLER MW, HILBURGER ME. Morphine depresses macrophage numbers and function in mouse spleens. *Adv Exp Med Biol* 1998; **437**: 33-41.
- [20] ELENKOV IJ, WILDER RL, CHROUSOS GP, VIZI ES. The sympathetic nerve – an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000; **52**: 595-638.
- [21] FECHO K, MASLONEK KA, DYKSTRA LA, LYSLE DT. Evidence for sympathetic and adrenal involvement in the immunomodulatory effects of acute morphine treatment in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; **277**: 633-645.
- [22] FECHO K, MASLONEK KA, DYKSTRA LA, LYSLE DT. Assessment of the involvement of central nervous system and peripheral opioid receptors in the immunomodulatory effects of acute morphine treatment in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; **276**: 626-636.
- [23] FUCHS BA, ALBRIGHT JW, ALBRIGHT JF. Beta-adrenergic receptors on murine lymphocytes: density varies with cell maturity and lymphocyte subtype and is decreased after antigen administration. *Cell Immunol* 1988; **114**: 231-245.
- [24] GAVERIAUX C, PELUSO J, SIMONIN F, LAFORET J, KIEFFER B. Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells. *FEBS Lett* 1995; **369**: 272-276.
- [25] GOMEZ-FLORES R, SUO JL, WEBER RJ. Suppression of splenic macrophage functions following acute morphine action in the rat mesencephalon periaqueductal gray. *Brain Behav Immun* 1999; **13**: 212-224.
- [26] GOMEZ-FLORES R, WEBER RJ. Immunomodulation of macrophage functions by opioids. *Adv Exp Med Biol* 1998; **437**: 13-19.
- [27] GOODKIN K, SHAPSHAK P, METSCH LR, MCCOY CB, CRANDALL KA, KUMAR M, FUJIMURA RK, MCCOY V, ZHANG BT, REYBLAT S, XIN KQ, KUMAR AM. Cocaine abuse and HIV-1 infection: epidemiology and neuropathogenesis. *J Neuroimmunol* 1998; **83**: 88-101.

- [28] GRIMM MC, BEN-BARUCH A, TAUB DD, HOWARD OM, RESAU JH, WANG JM, ALI H, RICHARDSON R, SNYDERMAN R, OPPENHEIM JJ. Opiates transdeactivate chemokine receptors: delta and mu opiate receptor-mediated heterologous desensitization. *J Exp Med* 1998; **188**: 317-325.
- [29] GRIMM MC, BEN-BARUCH A, TAUB DD, HOWARD OM, WANG JM, OPPENHEIM JJ. Opiate inhibition of chemokine-induced chemotaxis. *Ann N Y Acad Sci* 1998; **840**: 9-20.
- [30] HALL DM, SUO JL, WEBER RJ. Opioid mediated effects on the immune system: sympathetic nervous system involvement. *J Neuroimmunol* 1998; **83**: 29-35.
- [31] HEDNER T, CASSUTO J. Opioids and opioid receptors in peripheral tissues. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1987; **130**: 27-46.
- [32] HOUGHTLING RA, MELLON RD, TAN RJ, BAYER BM. Acute effects of morphine on blood lymphocyte proliferation and plasma IL-6 levels. *Ann N Y Acad Sci* 2000; **917**: 771-777.
- [33] JOZEFOWSKI S, PLYTYCZ B. Characterization of opiate binding sites on the goldfish (*Carassius auratus* L.) pronephric leukocytes. *Pol J Pharmacol* 1997; **49**: 229-237.
- [34] JOZEFOWSKI SJ, PLYTYCZ B. Characterization of beta-adrenergic receptors in fish and amphibian lymphoid organs. *Dev Comp Immunol* 1998; **22**: 587-603.
- [35] KOLACZKOWSKA E, MENASZEK E, SELJELID R, PLYTYCZ B. Experimental peritonitis in anuran amphibians is not suppressed by morphine treatment. *Pol J Pharmacol* 2000; **52**: 323-326.
- [36] KOLACZKOWSKA E, SELJELID R, PLYTYCZ B. Critical role of mast cells in morphine-mediated impairment of zymosan-induced peritonitis in mice. *Inflamm Res* 2001; **50**: 415-421.
- [37] LASEK W, GACIONG Z. Immunomodulacja. [w] Jakóbsiak M [red.] Immunologia. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 1998: 564-591.
- [38] LIKAR R, SITTL R, GRAGGER K, PIPAM W, BLATNIG H, BRESCHAN C, SCHALK HV, STEIN C, SCHAFER M. Peripheral morphine analgesia in dental surgery. *Pain* 1998; **76**: 145-150.
- [39] MAJEWSKI P, MARKOWSKA M, CHADZINSKA M, SKWARLO-SONTA K, PLYTYCZ B. Differential effects of morphine on peritoneal inflammation in vertebrates. [w] Lach H [red.] Molecular and Physiological Aspects of Regulatory Processes of the Organism. Kraków: Wydawnictwo Naukowe AP 2000: 279-280.
- [40] MAKMAN MH. Morphine receptors in immunocytes and neurons. *Adv Neuroimmunol* 1994; **4**: 69-82.
- [41] MAKMAN MH, BILFINGER TV, STEFANO GB. Human granulocytes contain an opiate alkaloid-selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis. *J Immunol* 1995; **154**: 1323-1330.
- [42] MAKMAN MH, DVORKIN B, STEFANO GB. Murine macrophage cell lines contain mu 3-opiate receptors. *Eur J Pharmacol* 1995; **273**: R5-6.
- [43] MATHEWS PM, FROELICH CJ, SIBBITT WL, JR., BANKHURST AD. Enhancement of natural cytotoxicity by beta-endorphin. *J Immunol* 1983; **130**: 1658-1662.
- [44] MELLON RD, BAYER BM. Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: review of potential mechanism(s) of action. *J Neuroimmunol* 1998; **83**: 19-28.
- [45] NEGRI L, MELCHIORRI P, LATTANZI R. Pharmacology of amphibian opiate peptides. *Peptides* 2000; **21**: 1639-1647.
- [46] NELSON CJ, SCHNEIDER GM, LYSLE DT. Involvement of central mu- but not delta- or kappa-opioid receptors in immunomodulation. *Brain Behav Immun* 2000; **14**: 170-184.
- [47] NI X, GRITMAN KR, EISENSTEIN TK, ADLER MW, ARFORS KE, TUMA RF. Morphine attenuates leukocyte/endothelial interactions. *Microvasc Res* 2000; **60**: 121-130.
- [48] PASNIK J. Endogenne peptydy opioidowe: nowe cytokiny? *Post Biol Kom* 1997; **24**: 519-542.
- [49] PENG X, MOSSER DM, ADLER MW, ROGERS TJ, MEISSLER JJ, JR., EISENSTEIN TK. Morphine enhances interleukin-12 and the production of other pro-inflammatory cytokines in mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 2000; **68**: 723-728.
- [50] PETERSON PK, GEKKER G, HU S, SHENG WS, MOLITOR TW, CHAO CC. Morphine stimulates phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human microglial cells: involvement of a G protein-coupled opiate receptor. *Adv Neuroimmunol* 1995; **5**: 299-309.
- [51] PETERSON PK, MOLITOR TW, CHAO CC. The opioid-cytokine connection. *J Neuroimmunol* 1998; **83**: 63-69.
- [52] PETERSON PK, MOLITOR TW, CHAO CC. Mechanisms of morphine-induced immunomodulation. *Biochem Pharmacol* 1993; **46**: 343-348.

- [53] PLYTYCZ B, SELJELID R. Nervous-endocrine-immune interactions in vertebrates. [w] Anderson DP [red.] Modulators of Immune Responses. The Evolutionary Trail. Fair Haven: SOS Publications 1996: 119-130.
- [54] PRZEWLOCKI R, HASSAN AH, LASON W, EPPLEN C, HERZ A, STEIN C. Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: functional role in antinociception. *Neuroscience* 1992; **48**: 491-500.
- [55] PRZEWLOCKI R, PRZEWLOCKA B. Receptory opioidowe. [w] Zawilska JB [red.] Receptory: struktura, charakterystyka, funkcja. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 1997: 224-237.
- [56] PUIG MM, POL O. Peripheral effects of opioids in a model of chronic intestinal inflammation in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; **287**: 1068-1075.
- [57] RISDAHL JM, KHANNA KV, PETERSON PK, MOLITOR TW. Opiates and infection. *J Neuroimmunol* 1998; **83**: 4-18.
- [58] ROY S, LOH HH. Effects of opioids on the immune system. *Neurochem Res* 1996; **21**: 1375-1386.
- [59] SEDQI M, ROY S, RAMAKRISHNAN S, ELDE R, LOH HH. Complementary DNA cloning of a mu-opioid receptor from rat peritoneal macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **209**: 563-574.
- [60] SHARP BM, ROY S, BIDLACK JM. Evidence for opioid receptors on cells involved in host defense and the immune system. *J Neuroimmunol* 1998; **83**: 45-56.
- [61] SHAVIT Y, DEPAULIS A, MARTIN FC, TERMAN GW, PECHNICK RN, ZANE CJ, GALE RP, LIEBESKIND JC. Involvement of brain opiate receptors in the immune-suppressive effect of morphine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; **83**: 7114-7117.
- [62] SHAVIT Y, LEWIS JW, TERMAN GW, GALE RP, LIEBESKIND JC. Opioid peptides mediate the suppressive effect of stress on natural killer cell cytotoxicity. *Science* 1984; **223**: 188-190.
- [63] SHAVIT Y, MARTIN FC, YIRMIYA R, BEN-ELIYAHU S, TERMAN GW, WEINER H, GALE RP, LIEBESKIND JC. Effects of a single administration of morphine or footshock stress on natural killer cell cytotoxicity. *Brain Behav Immun* 1987; **1**: 318-328.
- [64] SINGHAL PC, BHASKARAN M, PATEL J, PATEL K, KASINATH BS, DURAISAMY S, FRANKI N, REDDY K, KAPASI AA. Role of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Fas-Fas ligand interaction in morphine-induced macrophage apoptosis. *J Immunol* 2002; **168**: 4025-4033.
- [65] SINGHAL PC, SHARMA P, KAPASI AA, REDDY K, FRANKI N, GIBBONS N. Morphine enhances macrophage apoptosis. *J Immunol* 1998; **160**: 1886-1893.
- [66] SOWA G, GEKKER G, LIPOVSKY MM, HU S, CHAO CC, MOLITOR TW, PETERSON PK. Inhibition of swine microglial cell phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by femtomolar concentrations of morphine. *Biochem Pharmacol* 1997; **53**: 823-828.
- [67] SPECTOR S, KANTROWITZ JD, OKA K. Presence of endogenous morphine in toad skin. *Prog Clin Biol Res* 1985; **192**: 329-332.
- [68] SPECTOR S, MUNJAL I, SCHMIDT DE. Endogenous morphine and codeine. Possible role as endogenous anticonvulsants. *Brain Res* 2001; **915**: 155-160.
- [69] STEFANO GB, GOUMON Y, CASARES F, CADET P, FRICCHIONE GL, RIALAS C, PETER D, SONETTI D, GUARNA M, WELTERS ID, BIANCHI E. Endogenous morphine. *Trends Neurosci* 2000; **23**: 436-442.
- [70] STEFANO GB, SALZET B, FRICCHIONE GL. Enkephalin and opioid peptide association in invertebrates and vertebrates: immune activation and pain. *Immunol Today* 1998; **19**: 265-268.
- [71] STEFANO GB, SCHARRER B, SMITH EM, HUGHES TK, JR., MAGAZINE HI, BILFINGER TV, HARTMAN AR, FRICCHIONE GL, LIU Y, MAKMAN MH. Opioid and opiate immunoregulatory processes. *Crit Rev Immunol* 1996; **16**: 109-144.
- [72] STEIN C, SCHAFER M, HASSAN AH. Peripheral opioid receptors. *Ann Med* 1995; **27**: 219-221.
- [73] SUZUKI S, MIYAGI T, CHUANG TK, CHUANG LF, DOI RH, CHUANG RY. Morphine upregulates mu opioid receptors of human and monkey lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **279**: 621-628.
- [74] THOMAS PT, BHARGAVA HN, HOUSE RV. Immunomodulatory effects of *in vitro* exposure to morphine and its metabolites. *Pharmacology* 1995; **50**: 51-62.
- [75] TOMEI EZ, RENAUD FL. Effect of morphine on Fc-mediated phagocytosis by murine macrophages *in vitro*. *J Neuroimmunol* 1997; **74**: 111-116.

- [76] WELTERS ID, MENZEBACH A, GOUMON Y, LANGEFELD TW, TESCHEMACHER H, HEMPELMANN G, STEFANO GB. Morphine suppresses complement receptor expression, phagocytosis, and respiratory burst in neutrophils by a nitric oxide and mu(3) opiate receptor-dependent mechanism. *J Neuroimmunol* 2000; **111**: 139-145.
- [77] WILLIAMS LT, SNYDERMAN R, LEFKOWITZ RJ. Identification of beta-adrenergic receptors in human lymphocytes by (-) (3H) alprenolol binding. *J Clin Invest* 1976; **57**: 149-155.
- [78] WYBRAN J, APPELBOOM T, FAMAHEY JP, GOVAERTS A. Suggestive evidence for receptors for morphine and methionine-enkephalin on normal human blood T lymphocytes. *J Immunol* 1979; **123**: 1068-1070.
- [79] YEAGER MP, COLACCHIO TA, YU CT, HILDEBRANDT L, HOWELL AL, WEISS J, GUYRE PM. Morphine inhibits spontaneous and cytokine-enhanced natural killer cell cytotoxicity in volunteers. *Anesthesiology* 1995; **83**: 500-508.

*Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak*

*Otrzymano: 18.02.2002 r.*

*Przyjęto: 23.05.2002 r.*

*Adres autora: ul. Ingardena 6, 30-060 Kraków*

*e-mail: [chadz@zuk.iz.ui.edu.pl](mailto:chadz@zuk.iz.ui.edu.pl)*





## DZIEDZICZNE ANEMIE HEMOLITYCZNE U MYSZY: OD PEŁNEJ CHARAKTERYSTYKI DO TERAPII GENOWEJ

THE HEREDITARY HAEMOLYTIC ANAEMIAS IN MICE:  
FROM COMPLETE CHARACTERISTICS TO GENE THERAPY

Dżamila Marta BOGUSŁAWSKA\*, Aleksander F. SIKORSKI\*,\*\*

\* Instytut Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Zielonogórski;

\*\*Instytut Biochemii, Uniwersytet Wrocławski

*Streszczenie:* Anemie hemolityczne u myszy przypominają dziedziczne defekty u ludzi. Defekty te umożliwiają precyzyjne zanalizowanie podstaw molekularnych tych schorzeń. Ponadto, pozwalają na dokonywanie prób terapii genowej korygującej te defekty, na przykład jak w procedurze opisanej przez Doonera i wsp. (Exp. Hematol. 2000; 28: 765-774). Zastosowane techniki dają nadzieję na wykorzystanie terapii genowej w leczeniu dziedzicznych ludzkich schorzeń, takich jak: anemia sierpowata, talasemia, recesywna sferocytoza i eliptycytoza.

*Słowa kluczowe:* dziedziczne anemie hemolityczne, terapia genowa, błona erytrocytu

*Summary:* Haemolytic anaemias in mice resemble hereditary defects in humans. These defects allow the precise analyses of the molecular basis of the diseases. Moreover, they allow attempts of "gene therapy" to correct these defects. An example of such a procedure was reported by Dooner et al. (Exp. Hematol. 2000; 28: 765-774). Techniques developed should have relevance to the development of gene therapy approaches to human hereditary disorders such as sickle cell anemia, thalassaemia, recessive spherocytosis and elliptocytosis.

*Keywords:* inherited haemolytic anaemias, gene therapy, erythrocyte membrane

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie jednej z udanych prób terapii genowej przeprowadzonej przez Doonera i współautorów w celu korekty mutacji powodującej dziedziczną sferocytozę u myszy [8]. Badania te dotyczą bezpośrednio dziedzicznej sferocytozy, ale z uwagi na stosowane techniki, takie jak: insercja cDNA kodującego białko o dużej masie, manipulacja komórkami *in vivo* i ekspresja genu swoistej tkanki,

można uznać je za bazę przysłych prób korekty niedokrwistości hemolitycznych, takich jak: talasemia, anemia sierpowata, recesywna sferocytoza, ostre postaci dziedzicznej eliptycytozy, jak również niedokrwistości związanych z anomaliami enzymów erytrocytów np. dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej.

Podłożem mysich i ludzkich dziedzicznych anemii hemolitycznych są najczęściej mutacje w genach kodujących białka błony erytrocytów [7,10,19,20,23]. Szczegółowe informacje dotyczące struktury i funkcji białek szkieletu błony erytrocytów znajdzie Czytelnik we wcześniejszych publikacjach [2,25]. Mutacje naturalnie występujące u myszy wyjaśniają kwestie niezrozumiałe w przypadku ludzkich odpowiedników tej choroby. Do anemii hemolitycznych naturalnie występujących zarówno u myszy, jak i u ludzi należą: dziedziczna sferocytoza (HS) i dziedziczna eliptycytoza (HE). Znany jest pierwszy mysi model ciężkiej postaci HE: mutacja  $sph^{Dem}$  spowodowana insercją w genie kodującym spektrynę  $\alpha$ , skutkiem czego jest upośledzenie tworzenia tetramerów spektryny w wyniku asocjacji jej dimerów [21]. Istnieje analogiczny przypadek ciężkiej HE u ludzi (mutacja Dayton) [11]. Mysia HE związana z mutacją  $sph^{Dem}$  jest cięższa w przebiegu niż mysia HS spowodowana mutacjami w genie kodującym spektrynę  $\alpha$  [7,20,21].

HS może mieć zróżnicowany przebieg kliniczny od bezobjawowego do letalnego w życiu płodowym, a jego podłożem jest defekt jednego z następujących białek błony erytrocytu – ankiryiny, spektryny, białka przenoszącego aniony lub białka 4.2 [19,23,25]. Istnieje kilka typów HS naturalnie występujących u myszy, których przyczyną są również mutacje w genach kodujących białka błony erytrocytu, tj. spektryny  $\alpha$  –  $Spn1$  ( $sph$ ,  $sph^{2BC}$ ,  $sph^J$ ), spektryny  $\beta$  –  $Spn1$  ( $ja$ ) oraz ankiryny –  $Ank1$  ( $nb$ ) [7,20,24]. Myszy  $ja/ja$  cierpią na ciężką anemię hemolityczną wywołaną całkowitym brakiem spektryny  $\beta$ , co związane jest z wymianą reszty argininy na kodon stop w mRNA kodującym powtórzenie 9 tego łańcucha polipeptydowego [6]. Mutacje  $ja/ja$  i  $sph/sph$  są przyczyną ciężkich anemii hemolitycznych z retikulocytozą przekraczającą 90% i czasem przeżycia krwinki wynoszącym zaledwie 1 dzień, przy czym myszy  $sph/sph$  przeżywają poza organizmem matki, a myszy  $ja/ja$  żyją zwykle tylko 4 dni po urodzeniu [4,5,7]. Mysie schorzenia przypominają bardzo ciężkie formy ludzkiej HS, które są zwykle przypadkami homozygot lub podwójnych heterozygot [10,22]. Mutacje podobne do obecnych u myszy  $ja/ja$  i  $sph/sph$ , u których obserwuje się całkowity brak ekspresji jednej z podjednostek spektryny, są u ludzi letalne w życiu płodowym lub wkrótce po urodzeniu. Przykładem może być przypadek recesywnie dziedziczonej HE, spowodowanej mutacją Providence, objawiającej się anomalią w ekspresji spektryny  $\beta$ , przy której śmierć płodu następuje w trzecim trymestrze ciąży [10]. Podobne skutki obserwuje się u ludzi w przypadku całkowitego braku spektryny [22]. Skuteczną metodą terapii ludzkiej HS jest splenektomia, natomiast myszy z ciężką HS po splenektomii nie przeżywały [4]. Dobre wyniki u myszy daje przeszczep szpiku kostnego [1]. Przeprowadzone badania nad skutkiem braku białka 4,2 w szkielecie błony erytrocytu u myszy (*protein 4.2-null*), u których defekt spowodowano metodą celowej mutagenyzy dowodzą, iż efektem takiej mutacji jest łagodna forma HS. Ich erytrocyty charakteryzują się zaburzoną równowagą jonów  $Na^+$  i  $K^+$  [15].

Szczególnie interesujące mutanty myszy nb/nb charakteryzują się sferocytozą spowodowaną dziedzicznym recesywnie defektem polegającym na syntezie skróconej ankiryiny. Ten przypadek jest analogiczny do ludzkiej HS spowodowanej przez mutację ankiryiny *Prague*, w wyniku której syntetyzowana jest skrócona ankiryina [19]. Mysz nb/nb ma minimalne ilości ankiryiny pełnej długości (białka wiążącego spektrynę do białka przenoszącego aniony) oraz około 50% ubytek spektryny. Dodatkowo istnieje tu drugi defekt polegający na ubytku białka 4,2 [16]. Istnieją obszerne dane genetyczne i molekularne dotyczące mutantów nb/nb [14, 24]. Analizy *Western blot* błon erytrocytów tych myszy wykazują znaczący ubytek ankiryiny o pełnej długości (210 kDa) z jednoczesnym pojawieniem się nowego peptydu o masie około 150 kDa reagującego z przeciwciałami przeciw ankiryinie erytrocytarnej. Stwierdzono równocześnie ubytek transkryptów mRNA o masie 9,0 i 7,5 tysiąca zasad kodowanego przez mysz gen ankiryiny Ank-1 (odpowiednik ludzkiego genu ANK 1) [3,12,13]. Defekt nb jest związany także z ubytkiem ankiryiny w komórkach Purkiniego i ziarnistych mózdzku, czego skutkiem są anomalie psychomotoryczne w wieku 6 miesięcy [14].

Dooner i in. przeprowadzili transfer cDNA ankiryiny do normalnych oraz sferocytowych nb/nb komórek szpiku kostnego z użyciem wektora retrowirusowego, co spowodowało ekspresję funkcjonalnej ankiryiny u mutantów nb/nb. Transdukcji komórek szpiku nb/nb dokonano z użyciem „minigenu” skonstruowanego z promotora ludzkiego genu ankiryiny ANK1, mysiego cDNA ankiryiny i domeny regulatorowej odpowiadającej izoformie ludzkiej ankiryiny 2.2 wbudowanych do wektora retrowirusowego pG1. Ten retrowirusowy wektor o wielkości około 4600 pz nie posiada genu Neo<sup>R</sup>. Transkrypty interesujących genów po przepisaniu na DNA mogły zostać włączone do genomu biorcy. By zredukować całkowity rozmiar cDNA ankiryiny nie zawarto sekwencji regulatorowej (domeny „2.2”), przez co zwiększono zdolność wiązania spektryny i białka przenoszącego aniony, ponieważ ankirynę 2.2 charakteryzuje zwiększone powinowactwo do obu białek [2]. Region promotora ludzkiego genu ANK1 o wielkości 270 pz [9] dodano do końca 5' nadając wrażliwość na ludzką erytropoetynę (EPO), co ułatwiło kontrolę ekspresji genu w transdukowanych komórkach myszy. Transdukcji retrowirusowym supernatantem poddano: krwinki erytroleukemicznych myszy (MEL), normalne mysie komórki szpiku kostnego, fibroblasty 3T3, komórki szpiku kostnego mutantów mysich nb/nb oraz komórki śledziony.

Komórki „produkujące” wirus uzyskiwano poprzez transfekcję komórek GP+86 za pomocą DNA wektora pG1 zawierającego „minigen” ankiryinowy z użyciem kationowych lipopleksów. Wyizolowane z supernatantu wirusowego RNA, jak i komórkowe RNA wyizolowane z komórek „producentów”, poddano analizom na obecność transgeny za pomocą reakcji RT-PCR (reakcja odwrotnej transkrypcji z następującą po niej reakcją łańcuchowej polimeryzacji) z użyciem starterów dla ludzkiej ankiryiny: antysensownego, swoistego dla ludzkiej ankiryiny i sensownego uniwersalnego, ponieważ cały region jest wysoce homologiczny dla obu gatunków. Następnie dokonano transdukcji komórek mysiej erytroleukemii (MEL) za pomocą supernatantu retrowirusowego. Reakcja RT-PCR wykazała obecność mRNA ankiryiny w 0, 2, 4 i 6

dniu po transdukcji. Analizy *Southern blot* wykazały obecność transgenu w ilości ok.  $10^6$  kopii na 10 mg genomowego DNA. Po 12 dniach nietransdukowane i transdukowane komórki MEL indukowano do różnicowania na podłożu fibro-*nektynowym* w obecności DMSO. Badania morfologiczne oraz immuno-fluorescencyjne z zastosowaniem przeciwciał przeciw ankiryinie wykazały, że transdukowane komórki MEL indukowane do różnicowania po enukleacji osiągają kształt polichromatofili. Obserwacje uzyskane techniką immunofluorescencji z użyciem przeciwciał przeciw ankiryinie potwierdziły funkcjonowanie genu ankiryiny. Analizy *RNA blot* komórek MEL wykazały obecność transkryptów mysiego mRNA o wielkości 9,0 i 7,5 tysięcy zasad w komórkach transdukowanych, natomiast w komórkach nietransdukowanych obserwowano prawie wyłącznie transkrypt o wielkości 7,5 tysięcy zasad.

Analizy RT-PCR komórek wywodzących się z transdukowanych komórek szpiku kostnego wykazały, że hodowle prowadzone w obecności erytropoetyny (EPO) zawierały znaczącą liczbę komórek ekspresjonujących mRNA ankiryinowe (26%), natomiast wśród komórek hodowanych w nieobecności EPO nie stwierdzono zawierających tego mRNA. W ilościowych analizach RT-PCR stwierdzono wyraźną różnicę w ilości mRNA na korzyść hodowli z EPO. W toku dalszych doświadczeń wyizolowano komórki z myszy nb/nb: komórki szpiku kostnego i śledziony. Transdukowane komórki szpiku kostnego i śledziony mutantów nb/nb hodowane w kulturach płynnych w obecności EPO dawały pozytywną reakcję w analizach PCR i RT-PCR. Analiza *Western blot* komórek szpiku kostnego indukowanych do różnicowania wykazywała obecność ankiryiny o pełnej długości tylko w komórkach transdukowanych. Podobne prążki obserwowano również w analizie *Western blot* transdukowanych komórek MEL. Natomiast w nietransdukowanych komórkach szpiku kostnego obserwowano jedynie mniejsze białko o masie ok. 150 kDa. Analizy morfologiczne prekursorów komórek nb/nb transdukowanych i nietransdukowanych w końcowych fazach różnicowania wykazały, że komórki nietransdukowane mutantu nb/nb tworzyły sferocyty i mikrosferocyty. Transdukowane prekursorowe komórki nb/nb, z kolei, tworzyły polichromatofile, a ich morfologia okazała się zbliżoną do normocytów. Dodatkowo, nietransdukowane komórki mutantu po enukleacji miały przeciętne rozmiary 3,8 x 3,9 mm, a transdukowane 6 x 6,5 mm.

Przedstawiony powyżej cykl doświadczeń wskazuje na to, że hybryda cDNA ankiryiny myszy i człowieka może ulegać skutecznej transdukcji przez retrowirusowy wektor pG1 do komórek MEL oraz komórek mutantu nb/nb szpiku kostnego i śledziony. Autorzy wykazali zwiększoną ekspresję mRNA ankiryiny w koloniach wzrastających w obecności EPO sugerując, że ludzki promotor ankiryiny odpowiada za ekspresję tego białka w komórkach normalnych i zmutowanych prekursorów erytrocytów.

Nie tylko promotor ankiryiny może być istotny w kierowaniu ekspresją ankiryiny, ale także promotory innych białek szkieletu błony erytrocytu mogą również odgrywać rolę w ekspresji innych białek erytrocytów, czego przykładem jest ekspresja genu  $\gamma$ -globiny z promotorem  $\beta$ -spektryny u transgenicznych myszy [17] oraz genu  $\gamma$ -globiny z promotorem ankiryiny w retrowirusowym wektorze użytym do transdukcji mysich

komórek [18]. W podobny sposób promotor ankiryny mógłby być wykorzystywany do tworzenia procedury terapii genowej w anemiach hemolitycznych spowodowanych innymi defektami erytrocytu np. talasemii lub anemii sierpowatej.

## LITERATURA

- [1] BARKER JE, DEVEAU S, WANDERSEE NJ. Amelioration of severe hereditary spherocytosis in nonablated adult mice by marrow transplantation. *Exp Hematol* 2000; **28**: 985-992.
- [2] BENNETT V, BAINES AJ. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol Rev* 2001; **81**:1353-1392.
- [3] BENNETT V, CHEN L. Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. *Curr Opin Cell Biol* 2001; **13**: 61-67.
- [4] BERNSTEIN SE. Inherited hemolytic disease in mice: a review and update. *Lab Anim Sci* 1980; **30**: 197-205.
- [5] BIRKENMEIER CS, MCFARLAND-STARR EC, BARKER JE. Chromosomal location of three spectrin genes: relationship to the inherited hemolytic anemias of mouse and man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 8121-8125.
- [6] BLOOM ML, KAYSER TM, BIRKENMEIER CS, BARKER JE. The murine mutation jaundiced is caused by replacement of an arginine with a stop codon in the mRNA encoding the ninth repeat of beta-spectrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 10099-10103.
- [7] BODINE DM 4TH, BIRKENMEIER CS, BARKER JE. Spectrin deficient inherited hemolytic anemias in the mouse: characterization by spectrin synthesis and mRNA activity in reticulocytes. *Cell* 1984; **37**: 721-729.
- [8] DOONER GJ, BARKER JE, GALLAGHER PG, DEBATIS ME, BROWN AH, FORGET BG, BECKER PS. Gene transfer to ankyrin-deficient bone marrow corrects spherocytosis *in vitro*. *Exp Hematol* 2000; **28**: 765-774.
- [9] GALLAGHER PG, SABATINO DE, BASSERES DS, NILSON DM, WONG C, CLINE AP, GARRETT LJ, BODINE DM. Erythrocyte ankyrin promoter mutations associated with recessive hereditary spherocytosis cause significant abnormalities in ankyrin expression. *J Biol Chem* 2001; **276**: 41683-41689.
- [10] HANUS-LORENZ B, LORENZ M, BOGUSŁAWSKA D, HEGER E, HRYNIEWICZ A, SIKORSKI AF. Mutacje w genach kodujących białka błony erytrocytu są przyczyną dziedzicznych anemii hemolitycznych. *Kosmos* 2001; **50**: 325-333.
- [11] HASSOUN H, COETZER TL, VASSILIADIS JN, SAHR KE, MAALOUF GJ, SAAD ST, CATANZARITI L, PALEK J. A novel mobile element inserted in the alpha spectrin gene: spectrin Dayton. A truncated alpha spectrin associated with hereditary elliptocytosis. *J Clin Invest* 1994; **94**: 643-648.
- [12] HRYNIEWICZ-JANKOWSKA A, CZOGALIA A, BOK E, SIKORSKI AF. Ankyrins; multifunctional proteins. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; (w druku).
- [13] MOHLER PJ, GRAMOLINI AO, BENNETT V. Ankyrins. *J Cell Sci* 2002; **115**: 1565-1566.
- [14] PETERS LL, BIRKENMEIER CS, BRONSON RT, WHITE RA, LUX SE, OTTO E, BENNETT V, HIGGINS A, BARKER JE. Purkinje cell degeneration associated with erythroid ankyrin deficiency in nb/nb mice. *J Cell Biol* 1991; **114**: 1233-1241.
- [15] PETERS LL, JINDEL HK, GWYNN B, KORSGREN C, JOHN KM, LUX SE, MOHANDAS N, COHEN CM, CHO MR, GOLAN DE, BRUGNARA C. Mild spherocytosis and altered red cell ion transport in protein 4.2-null mice. *J Clin Invest* 1999; **103**: 1527-1537.
- [16] RYBICKI AC, MUSTO S, SCHWARTZ RS. Decreased content of protein 4.2 in ankyrin-deficient normoblastosis (nb/nb) mouse red blood cells: evidence for ankyrin enhancement of protein 4.2 membrane binding. *Blood* 1995; **86**: 3583-3589.
- [17] SABATINO DE, CLINE AP, GALLAGHER PG, GARRETT LJ, STAMATOYANNOPOULOS G, FORGET BG, BODINE DM. Substitution of the human beta-spectrin promoter for the human A gamma-globin promoter prevents silencing of a linked human beta-globin gene in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 6634-6640.

- [18] SABATINO DE, SEIDEL NE, AVILES-MENDOZA GJ, CLINE AP, ANDERSON SM, GALLAGHER PG, BODINE DM. Long-term expression of gamma-globin mRNA in mouse erythrocytes from retrovirus vectors containing the human gamma-globin gene fused to the ankyrin-1 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 13294-13299.
- [19] TSE WT, LUX SE. Red blood cell membrane disorders. *Br J Haematol* 1999; **104**: 2-13.
- [20] WANDERSEE NJ, BIRKENMEIER CS, GIFFORD EJ, MOHANDAS N, BARKER JE. Murine recessive hereditary spherocytosis, sph/sph, is caused by a mutation in the erythroid alpha-spectrin gene. *Hematol J* 2000; **1**: 235-242.
- [21] WANDERSEE NJ, ROESCH AN, HAMBLEN NR, DE MOES J, VAN DER VALK MA, BRONSON RT, GIMM JA, MOHANDAS N, DEMANT P, BARKER JE. Defective spectrin integrity and neonatal thrombosis in the first mouse model for severe hereditary elliptocytosis. *Blood* 2001; **97**: 543-550.
- [22] WHITFIELD CF, FOLLWEILER JB, LOPRESTI-MORROW L, MILLER BA. Deficiency of alpha-spectrin synthesis in burst-forming units-erythroid in lethal hereditary spherocytosis. *Blood* 1991; **78**: 3043-3051.
- [23] YAWATA Y, KANZAKI A, YAWATA A, DOERFLER W, OZCAN R, EBER SW. Characteristic features of the genotype and phenotype of hereditary spherocytosis in the Japanese population. *Int J Hematol* 2000; **71**: 118-135.
- [24] YI SJ, LIU SC, DERICK LH, MURRAY J, BARKER JE, CHO MR, PALEK J, GOLAN DE. Red cell membranes of ankyrin-deficient nb/nb mice lack band 3 tetramers but contain normal membrane skeletons. *Biochemistry* 1997; **36**: 9596-9604.
- [25] ZHANG Z, WEED SA, GALLAGHER PG, MORROW JS. Dynamic molecular modeling of pathogenic mutations in the spectrin self-association domain. *Blood* 2001; **98**: 1645-1653.

*Redaktor prowadzący – Maciej Zabel*

*Otrzymano: 15.03.2002 r.*

*Przyjęto: 23.05.2002 r.*

*Adres autora: ul. Przybyszewskiego 63-77, 51-148 Wrocław*

*e-mail: [afsbc@ibmb.uni.wroc.pl](mailto:afsbc@ibmb.uni.wroc.pl)*

## REGULACJA EKSPRESJI GENÓW JĄDROWYCH PRZEZ SYGNAŁY PLASTYDOWE

### REGULATION OF EXPRESSION OF NUCLEAR GENES BY PLASTID SIGNALS

Grzegorz JACKOWSKI

Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

*Streszczenie:* W ostatnich latach zgromadzono liczne dowody eksperymentalne wskazujące, że ekspresja niektórych genów jądrowych, w szczególności tych, które kodują białka chloroplastowe, podlega retrogradowej regulacji przez sygnały pochodzenia plastydowego. Regulacja może się odbywać zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji mRNA. Niektóre sygnały pochodzenia plastydowego udało się zidentyfikować – należą do nich prekursorzy metaboliczne chlorofilu, stan redoks plastochinonu, tioredoksyny i glutationu, a także translokator fosfoenolopirogronianu, zlokalizowany w wewnętrznej błonie otoczki chloroplastowej. Tożsamość innych sygnałów plastydowych, np. regulujących różnicowanie komórek i morfogenezę liścia, pozostaje niewyjaśniona. Sygnalizacja plastydy-jądro komórkowe i sygnalizacja zależna od światła pozostają w dość skomplikowanych relacjach; w niektórych przypadkach wykorzystywane są odmienne szlaki transdukcyjne, w innych częściowo te same. Sygnalizacja retrogradowa jest prawdopodobnie ważnym elementem globalnej sieci powiązań regulacyjnych kontrolujących metabolizm i rozwój komórek roślinnych.

*Słowa kluczowe:* chlorofil, chloroplast, gen, plastyd, stan redoks, sygnalizacja retrogradowa

*Summary:* A considerable body of experimental evidence has been accumulated over recent years to suggest that an expression of defined nuclear genes, particularly the ones coding for chloroplast proteins, are controlled in retrograde fashion by signals of plastid origin. Transcription and translation level of expression of nuclear genes appear to be affected by retrograde signalling. Some plastid-to-nucleus signals have already been identified; they involve metabolic precursors of chlorophyll, redox state of plastoquinone, thioredoxin and glutathione pools as well as a phosphoenolpyruvate/phosphate translocator localised to an inner membrane of chloroplast envelope. In some cases the nature of plastid signals remains elusive; for instance the retrograde signals controlling cell differentiation and leaf morphogenesis have not been identified. Plastid-to-nucleus and light-dependent signalling are linked by rather complicated relations; in some cases the signalling pathways are separable, but in other cases the signalling may proceed, at least partially, through common steps. Retrograde signalling appears to be a seminal element of global regulatory network controlling plant cell development and metabolism.

*Key words:* chlorophyll, chloroplast, gen, plastid, redox state, retrograde signalling

W każdej komórce eukariotycznej funkcjonuje rozbudowana sieć sygnałów regulujących współdziałanie jądra i pozostałych organelli. Jednym z przejawów tej regulacji tego jest – w przypadku roślin wyższych i glonów – istnienie złożonych mechanizmów koordynujących ekspresję genów jądrowych i plastydowych. Koordynacja ekspresji genomu jądrowego i plastydowego polega na kontroli transkrypcji i translacji genów plastydowych przez produkty genów jądrowych (sygnalizacja anterogradowa) [4, 25], jednak od kilkunastu lat wiadomo, że funkcjonują także mechanizmy sygnalizacji retrogradowej, tzn. ekspresja genów jądrowych podlega regulacji przez sygnały pochodzenia plastydowego. Istnienia sygnalizacji retrogradowej plastyd-jądro komórkowe dowiedziono w doświadczeniach nad roślinami całkowicie lub częściowo pozbawionymi karotenoidów na skutek mutacji lub w rezultacie traktowania inhibitorami biosyntezy karotenoidów, takimi jak: norflurazon (hamuje aktywność desaturazy fitoenuwej) czy amitrol (hamuje aktywność cykazy likopenowej) [12, 15]. Plastydy pozbawione karotenoidów są bardzo podatne na uszkodzenia typu fotooksydacyjnego (karotenoidy pełnią funkcję wygaszaczy tripletowego stanu chlorofilu oraz tlenu singletowego) i – oświetlone – stają się praktycznie niefunkcjonalne. Stwierdzono, że rośliny pozbawione funkcjonalnych plastydów charakteryzują się obniżonym poziomem ekspresji niektórych genów jądrowych kodujących białka chloroplastowe, w tym genów rodziny *Lhcb*. Sugerowało to jednoznacznie istnienie w normalnych warunkach szlaku transmitującego do jądra jakieś sygnały plastydowe, utrzymujące odpowiedni poziom ekspresji genów jądrowych. Tożsamość sygnałów plastydowych pozostawała przez szereg lat całkowitą tajemnicą; dopiero w ciągu ostatnich kilku lat zgromadzono dane odnoszące się do natury chemicznej tych sygnałów. Niemal lawinowe tempo akumulacji tych informacji uzasadnia potrzebę opracowania polskojęzycznego przeglądu stanu wiedzy na temat tożsamości sygnałów plastydowych i szlaków regulacyjnych zmieniających ekspresję genów jądrowych pod działaniem sygnałów plastydowych. Niniejsze opracowanie pełni rolę takiego właśnie przeglądu.

## PREKURSORY CHLOROFILU Z GRUPY MAGNEZOPORFIRYN JAKO SYGNAŁY PLASTYDOWE

Funkcję estru metylowego magnezoproporofiryny IX (Mg ProtoMe IX) – intermediatu w szlaku biosyntezy chlorofilu – jako sygnału plastydowego regulującego ekspresję genów jądrowych zasugerowano po raz pierwszy na podstawie wyników eksperymentów, w których udowodniono, że traktowanie *Chlamydomonas reinhardtii* różnymi czynnikami blokującymi biosyntezę chlorofilu na etapie Mg ProtoMe IX (bipirydyd, cykloheksimid, warunki anaerobowe) prowadzi do osłabienia zależnej od światła akumulacji mRNA LHCP II i mniejszej podjednostki Rubisco, podczas gdy



zablokowanie syntezy chlorofilu na innych etapach nie ma wpływu na poziom akumulacji wspomnianych transkryptów [6]. Nowsze doniesienia wskazują na to, że rolę sygnału plastydowego może pełnić – poza Mg ProtoMe IX – także jego bezpośredni prekursor, magnezoproporfiryna IX (Mg Proto IX), obydwa bowiem związki indukują u *Chlamydomonas reinhardtii* ekspresję dwóch jądrowych genów szoku cieplnego, *HSP70A* i *HSP70B*, a u roślin wyższych (*Lepidium sativum*) znacznie osłabiają ekspresję jądrowych genów rodziny *Lhca* i *Lhcb* [10, 19]. W warunkach kontrolnych dla ekspresji *HSP70A* i *HSP70B* niezbędne jest działanie wysokiej temperatury lub światła, jednak traktowanie komórek *Chlamydomonas* za pomocą Mg Proto IX i Mg ProtoMe IX umożliwia pojawienie się transkryptów także w ciemności [10]. Światło działa najprawdopodobniej jako czynnik powodujący przejściowe, bardzo znaczne podwyższenie puli Mg Proto IX i Mg ProtoMe IX, na co wskazują zarówno wyniki bezpośrednich analiz biochemicznych poziomu tych prekursorów w komórkach *Chlamydomonas* po oświetleniu hodowli, jak i fakt, że znany od kilku lat mutant *Chlamydomonas* niezdolny do światło-zależnej indukcji *HSP70A* i *HSP70B* ma defekt w obrębie szlaku biosyntetycznego chlorofilu, powodujący niezdolność do syntezy magnezoporfiryn [11]. W próbach rozszyfrowania szlaku sygnałowego prowadzącego od magnezoporfiryn do jądra komórkowego intensywnie wykorzystywana jest seria mutantów *Arabidopsis thaliana gun 1-5*, u których transkrypcja *Lhcb* nie jest – jak w przypadku roślin dzikich – hamowana w ślad za fotouszkodzeniem plastydów. Oznacza to, że u tych form nie funkcjonuje sygnalizacja plastyd-jądro komórkowe. Ostatnio sklonowano jeden z alleli serii *gun*, *GUN5*, kodujący – jak się okazało – katalityczną podjednostkę ChlH Mg-chelatazy, zlokalizowanego w wewnętrznej błonie otoczki chloroplastowej enzymu katalizującego przekształcenie protoporfiryny IX (PROTO IX) w Mg PROTO IX [16]. Zdaniem autorów tego doniesienia katalityczna podjednostka ChlH Mg-chelatazy pełni ważną funkcję w zależnym od magnezoporfiryn szlaku sygnalizacji plastyd-jądro komórkowe, a mianowicie jest sensorem “wyczuwającym” zmiany stężenia magnezoporfiryn na terenie otoczki chloroplastowej i wysyłającym informację o tych zmianach do jądra komórkowego. Na terenie jądra komórkowego transkrypcja *Lhcb* mogłaby być hamowana – w odpowiedzi na podwyższenie poziomu magnezoporfiryn – przez aktywację represora transkrypcji lub przez inhibicję aktywatora transkrypcji. Hamowanie ekspresji *Lhcb* mogłoby także następować poprzez destabilizację mRNA, a regulującą funkcję na tym poziomie mógłby odgrywać produkt jądrowego genu *cen*, zidentyfikowany u *Chlamydomonas reinhardtii*. Otoczka chloroplastowa wydaje się być idealnym miejscem lokalizacji dla sensora uczestniczącego w transdukcji sygnału na trasie plastyd-jądro komórkowe, ponieważ tak umiejscowiony sensor ma możliwość wchodzenia w interakcje z czynnikami cytozolowymi transmitującymi sygnał w kierunku jądra. Sensorowa aktywność ChlH może podlegać modulacji ze strony oddziałujących z nią podjednostek regulacyjnych Mg-chelatazy (ChlD, ChlI) oraz produktami genów *GUN1* i *GUN2*, będącymi enzymami stromy chloroplastowej zaangażowanymi w przekształcenie hemu w fitochromobilinę [25, 27].

## PROTOPORFIRYNA IX (PROTO IX) JAKO SYGNAŁ PLASTYDOWY

Wyniki prac nad mutantami *laf6 Arabidopsis thaliana* (obniżona reaktywność na ciągle oświetlenie daleką czerwienią) wskazują, że sygnałem plastydowym regulującym (niezależnie od magnezoporfiryn lub w kooperacji z nimi) ekspresję genów jądrowych może być także PROTO IX, bezpośredni prekursor Mg PROTO IX w szlaku biosyntezy chlorofilu. Regulacji ze strony PROTO IX miałyby podlegać ekspresja jądrowych genów rodziny *Lhcb* oraz genów kodujących syntazę chalkonową i reduktazę ferredoksyna:NADP<sup>+</sup> [17]. Aktywność sygnałowa porfiryn i magnezoporfiryn plastydowych jest kolejnym przykładem regulacyjnych zdolności związków opartych w swojej budowie na szkieletcie pierścieni pirolowych. Wiadomo, że hem może pełnić funkcję mitochondrialnego sygnału modulującego ekspresję genów jądrowych kodujących białka mitochondrialne [13].

## PLASTYDOWE SYGNAŁY REDOKS

Kontrolą redoks zjawiska biologicznego nazywa się regulację procesu metabolicznego na poziomie molekularnym przez stan oksydoredukcyjny określonej cząsteczki (lub kilku cząsteczek) [23]. Już dawno udowodniono, że wiele procesów podlega regulacji przez sygnały redoks jednak dopiero od kilku lat gromadzone są dane sugerujące, że ekspresja genów jądrowych u glonów i roślin wyższych może podlegać kontroli przez sygnały redoks pochodzenia plastydowego. Najwcześniej opisanym przykładem tego typu jest regulacja poziomu akumulacji transkryptów genów *Lhcb* u glonu *Dunaliella tertiolecta* w odpowiedzi na zmiany natężenia światła. W warunkach kontaktu z niskimi natężeniami światła następuje względny przyrost poziomu transkryptów *Lhcb*, podczas gdy kontakt z wysokimi natężeniami światła prowadzi do odwrotnej odpowiedzi [2]. Ustalono, że regulacja odbywa się na poziomie transkrypcji, a nie stabilności transkryptów. Z kolei eksperymenty z zastosowaniem DCMU, inhibitora redukcji plastochinonu oraz DBMIB, inhibitora utleniania plastochinonu pozwoliły na ustalenie, że transkrypcja *Lhcb* jest hamowana przez zredukowany plastochinon, a stymulowana przez plastochinon w formie utlenionej. Stan redoks puli plastochinonu jest zatem sygnałem plastydowym regulującym poziom ekspresji *Lhcb* [2]. Autorzy opisywanych badań przypuszczają, że sygnał plastydowy dociera do jądra komórkowego z wykorzystaniem kaskady fosforylacyjnej. W myśl tych przypuszczeń plastochinol miałby aktywować kinazę fosforylującą niezidentyfikowane białko efektorowe błony tylakoidowej, przechodzące w rezultacie ufosforylowania w formę rozpuszczalną, zdolną do przedostania się przez otoczkę chloroplastową do cytoplazmy i aktywacji – poprzez kolejną fosforylację – represora blokującego region promotorowy genów *Lhcb* (ryc. 1). Innym przykładem regulacji ekspresji genu jądrowego przez sygnał plastydowy redoks jest stymulacja aktywności promotora genu kodującego

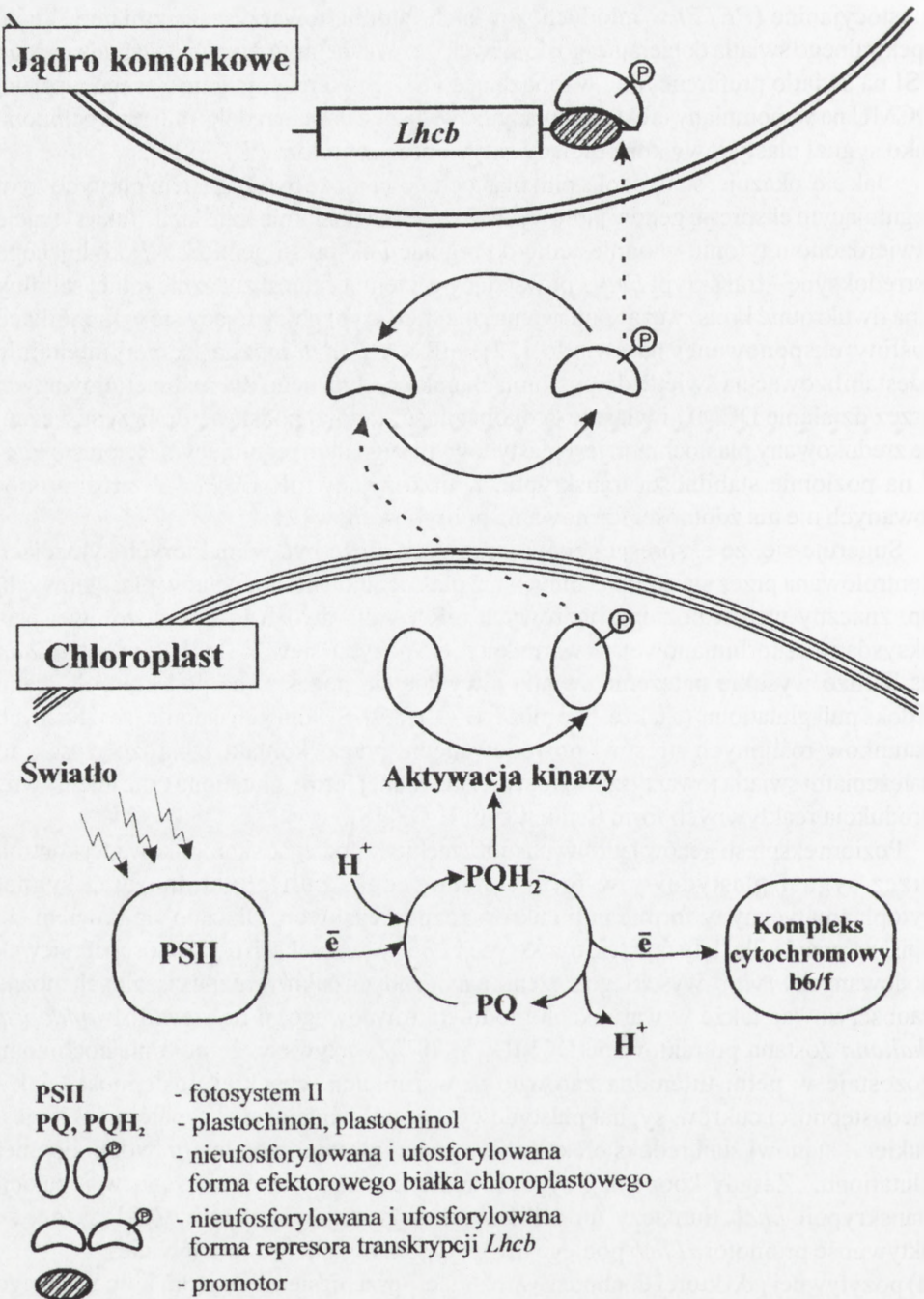
plastocyaninę (*PETE*) w młodych siewkach tytoniu, towarzysząca zmianie składu spektralnego światła docierającego do siewek ze światła preferencyjnie wzbudzającego PSI na światło preferencyjnie wzbudzające PSII. Stwierdzenie hamującego wpływu DCMU na wspomniany efekt stymulacyjny wskazuje na stan redoks puli plastochinonu jako sygnał plastydowy kontrolujący aktywność promotora *PETE* [24].

Jak się okazuje, stan redoks puli plastochinonu może być sygnałem plastydowym regulującym ekspresję genów jądrowych również na poziomie translacji. Taką sytuację stwierdzono u tytoniu w odniesieniu do regulacji ekspresji genu *Fed-1*, kodującego ferredoksyne – transkrypt *Fed-1* powstający w ciemności jest znacznie mniej stabilny (ma dwukrotnie krótszy czas półtrwania) niż transkrypt pojawiający się w komórkach rośliny eksponowanej na światło [22]. mRNA *Fed-1* można eksperymentalnie zdestabilizować na świetle do poziomu charakterystycznego dla roślin etiolowanych przez działanie DCMU i właśnie ta okoliczność stanowi podstawę do przypuszczeń, że zredukowany plastochinon jest plastydowym sygnałem regulującym ekspresję *Fed-1* na poziomie stabilności transkryptu. Krótko żyjący mRNA *Fed-1* z roślin etiolowanych nie ma zdolności formowania polirybosomów [21].

Sugeruje się, że ekspresja genów jądrowych może być w niektórych sytuacjach kontrolowana przez stan redoks innych niż plastochinon komponentów plastydowych, np. znaczny wzrost poziomu jądrowych mRNA dla dwóch form cytozolowej peroksydazy askorbinianowej w warunkach ekspozycji siewek *Arabidopsis thaliana* na bardzo wysokie natężenie światła wydaje się pozostawać pod kontrolą stanu redoks puli glutationu (a także, być może,  $H_2O_2$ ) [8,9]. Skądinąd wiadomo, że u licznych gatunków roślinnych stresowi powodowanemu przez kontakt z bardzo wysokimi natężeniami światła towarzyszy wzrost puli utlenionej formy glutationu oraz intensywne produkcja reaktywnych form tlenu, w tym  $H_2O_2$  [18].

Poziom ekspresji genów jądrowych może niekiedy podlegać skomplikowanej kontroli przez sygnał plastydowy w formie stanu redoks puli glutationu oraz sygnał cytoplazmatyczny w formie puli cukrów rozpuszczalnych. Okazało się bowiem, że opisaną przed kilku laty represję transkrypcji *Lhcb* w warunkach dostępności dla siewek hodowanych *in vitro* wysokiego stężenia egzogennych cukrów rozpuszczalnych można zaobserwować także w warunkach głodu cukrowego, o ile siewki *Arabidopsis thaliana* zostaną potraktowane DCMU [5, 20]. Zważywszy, że pula plastochinonu pozostaje w pełni utleniona zarówno w warunkach wysokiej dostępności, jak i niedostępności cukrów, sygnał plastydowy – współdziałający z sygnałem, jakim jest cukier – stanowi stan redoks efektora innego niż plastochinon, najprawdopodobniej glutationu. Zasady kooperacji sygnału plastydowego i cytozolowego w regulacji transkrypcji *Lhcb* tłumaczy model tzw. pozytywnego regulatora. Zakłada on, że aktywność promotora *Lhcb* podlega dwóm typom regulacji, a mianowicie

- a) pozytywnej, do której dochodzi w rezultacie przeniesienia do jądra komórkowego sygnału plastydowego w formie puli zredukowanego glutationu,
- b) negatywnej, do której dochodzi w rezultacie przeniesienia do jądra sygnału cytozolowego w formie wysokiego stężenia cukrów rozpuszczalnych.



RYCINA 1. Model regulacji ekspresji jądrowych genów *Lhcb* przez stan redoks puli plastochinonu (wg [2], zmienione)

Tak więc poziom ekspresji *Lhcb* u roślin wyższych miałyby odzwierciedlać stan równowagi między zależną od sygnałów plastydowych stymulacją i supresją zależną od sygnałów cytozolowych [20].

Natura chemiczna plastydowych sygnałów redoks pozostaje w niektórych układach eksperymentalnych nieznana, np. nie udało się narazie ustalić, stan redoks jakiego efektora plastydowego reguluje poziom aktywności promotora jądrowych genów kodujących dwa białka PSI (PsaD i PsaF) w odpowiedzi na zmiany spektrum światła docierającego do rośliny [24]. Zdaniem niektórych badaczy w regulacji ekspresji genów jądrowych kodujących białka aparatu fotosyntetycznego, do której dochodzi w odpowiedzi na zmiany natężenia światła mogą uczestniczyć w hierarchicznym porządku różne plastydowe sygnały redoks. Stan redoks puli plastochinonu miałyby sygnalizować jądro komórkowemu zmiany w zakresie relatywnie niskich natężeń światła aż do punktu, w którym cała pula plastochinonu uległaby redukcji. W takich warunkach, zdaniem autorów tej koncepcji, funkcję regulatora ekspresji genów jądrowych przejmowałby stan redoks puli tioredoksyny. Z kolei w warunkach oświetlenia światłem o tak znacznym natężeniu, że kontakt z nim spowodowałby redukcję całej puli tioredoksyny funkcję sygnału regulującego ekspresję genów jądrowych mógłby przejmować stan redoks glutationu oraz reaktywne formy tlenu, wśród nich  $H_2O_2$  [23].

## FOSFOENOLOPIROGRONIAN (PEP) JAKO SYGNAŁ PLASTYDOWY

Seria mutantów *cue 1-1/1-8 Arabidopsis thaliana*, mapujących się w locus kodującym translokator PEPu, zlokalizowany w wewnętrznej błonie otoczki chloroplastowej, cechuje się obniżonym o 20–65% poziomem zależnej od światła ekspresji jądrowych genów *Lhcb* [26]. Funkcja wspomnianego translokatora polega na transportowaniu do wnętrza chloroplastu PEP, który staje się w stromie chloroplastowej prekursorem aminokwasów aromatycznych w szlaku kwasu szikimowego oraz prekursorem izopentenylu, zasilającego z kolei szlaki biosyntetyczne karotenoidów, chlorofilu i plastochinonu [14]. Wydaje się wysoce prawdopodobne, że właśnie metabolity, których synteza zależy od dostępności plastydowej puli PEPu, odgrywają istotną rolę w percepcji bodźca świetlnego i reagowaniu przez roślinę na zmiany natężenia światła w formie zróżnicowanej ekspresji *Lhcb*.

## SYGNAŁY, KTÓRYCH TOŻSAMOŚĆ NIE ZOSTAŁA USTALONA

W ostatnich latach opisano u kilku gatunków roślinnych (rzodkiewnik, wyzlin, pomidor) mutanty o obniżonym poziomie określonych białek chloroplastowych, charakteryzujące się zarazem zaburzeniami w procesie morfogenezy liści, polegającymi na pojawianiu się białych sektorów, brakiem lub nietypowym wykształceniem się

komórek miękiszu palisadowego lub epidermy itd. Istnienie takich mutantów nasuwa przypuszczenie, że stan rozwojowy lub metaboliczny plastydów może być czynnikiem regulującym różnicowanie komórek i morfogenezę liścia, których przebieg w znacznym stopniu determinowany jest ekspresją genów jądrowych. Jeśli istotnie różnicowanie komórek i morfogeneza liścia pozostaje, przynajmniej częściowo, pod kontrolą genów jądrowych regulowanych przez sygnały plastydowe, to powstaje pytanie: czy sygnałami tymi mogłyby być któreś z efektorów opisanych w poprzednich podrozdziałach niniejszego opracowania kontrolujących ekspresję jądrowych genów kodujących białka fotosyntetyczne, tzn. prekursorzy chlorofilu, stan redoks różnych metabolitów czy translokator PEP? Wydaje się, że stan rozwojowy lub metaboliczny chloroplastu jest przesyłany genom jądrowym kontrolującym morfogenezę liścia i różnicowanie komórek poprzez te same sygnały. Tak w każdym razie można sądzić opierając się na obserwacji, że u niemal wszystkich wspomnianych wyżej mutantów zmienionemu wzorowi morfogenezy liścia i różnicowania jego komórek towarzyszy znaczna redukcja akumulacji mRNA *Lhcb* na obszarze zmienionych sektorów [1, 3, 7].

## LITERATURA

- [1] CAROL P, STEVENSON PM, BISANZ C, BREIDENBACH J, SNADMANN G, MACHER, COUPLAND G. Mutations of the *Arabidopsis* gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell* 2000; **11**: 57-68.
- [2] ESCOUBAS J-M, LOMAS M, LAROCHE J, FALKOWSKI PG. Light intensity regulation of *cab* gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 10237-10241.
- [3] ESTEVEZ JM, CANTERO A, ROMERO C, KAWAIDE H, JIMENEZ LF, KUZUYAMA T, SETO H, KAMIYA Y, LEON P. Analysis of the expression of CLA1, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2000; **124**: 95-103.
- [4] GOLDSCHMIDT-CLERMONT M. Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *Int Rev Cytol* 1998; **177**: 115-180.
- [5] JANG JC, SHEEN J. Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci* 1997; **7**: 208-214.
- [6] JOHANNINGMEIER U. Possible control of transcript levels by chlorophyll precursors in *Chlamydomonas*. *Eur J Biochem* 1988; **177**: 417-424.
- [7] JOSSE E-M, SIMKIN A, GAFFE J, LABOURNE A-M, KUNTZ M, CAROL P. A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiol* 2000; **123**: 1427-1436.
- [8] KARPIŃSKI S, ESCOBAR C, KARPIŃSKA B, CREISSEN G, MULLINEAUX PM. Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis thaliana* during excess light stress. *Plant Cell* 1997; **9**: 627-640.
- [9] KARPIŃSKI S, REYNOLDS H, KARPIŃSKA B, WINGSLE G, CREISSEN G, MULLINEAUX PM. Systemic signalling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 1999; **284**: 654-657.
- [10] KROPAT J, OSTER U, RUDIGER W, BECK CF. Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 14168-14172.
- [11] KROPAT J, OSTER U, RUDIGER W, BECK CF. Chloroplast signalling in the light induction of nuclear HSP70 genes requires the accumulation of chlorophyll precursors and their accessibility to cytoplasm-nucleus communication. *Plant J* 2000; **24**: 523-531.

- [12] LAROCCA N, RASCIO N, OSTER U, RUDIGER W. Amitrole treatment of etiolated barley seedlings leads to deregulation of tetrapyrrole synthesis and to reduced expression of *Lhc* and *RbcS* genes. *Planta* 2001; **213**: 101-108.
- [13] LEON P. Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998; **49**: 453-480.
- [14] LICHTENTHALER HK, ROHMET M, SCHWENDER J. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol Plant* 1997; **101**: 643-652.
- [15] MAYFIELD SP, TAYLOR WC. Carotenoid-deficient maize seedlings fail to accumulate light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein (LHCP) mRNA. *Eur J Biochem* 1984; **144**: 79-84.
- [16] MOCHIZUKI N, BRUSSLAN JA, LARKIN R, NAGATANI A, CHORY J. *Arabidopsis* genomes uncoupled 5 (*GUN5*) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 2053-2058.
- [17] MOLLER SG, KUNKELT T, CHUA N-H. A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signalling. *Genes Develop* 2001; **15**: 90-103.
- [18] NOCTOR G, FOYER C. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Biol* 1998; **49**: 249-279.
- [19] OSTER U, BRUNER H, RUDIGER W. The greening in cress seedlings. V. Possible interference of chlorophyll precursors, accumulated after thujaplicin treatment, with light-regulated expression of *Lhc* genes. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1996; **36**: 255-261.
- [20] OSWALD O, MARTIN T, DOMINY P, GRAHAM IA. Plastid redox state and sugars : interactive regulators of nuclear -encoded photosynthetic gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 2047-2052.
- [21] PETRACEK ME, DICKEY LF, HUBER SC, THOMPSEN WF. Light-regulated changes in abundance and polyribosome association of ferredoxin mRNA are dependent on photosynthesis. *Plant Cell* 1997; **9**: 22991-2230.
- [22] PETRACEK ME, DICKEY LF, NGUYEN TT, GATZ C, SOWINSKI DA, ALLEN GC, THOMPSEN WF. Ferredoxin-1 mRNA is destabilised by changes in photosynthetic electron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 9009-9013.
- [23] PFANNSCHMIDT T, ALLEN JF, OELMULLER R. Principles of redox control in photosynthesis gene expression. *Physiol Plant* 2001; **112**: 1-9.
- [24] PFANNSCHMIDT T, SCHUTZE K, BROSS M, OELMULLER R. A novel mechanism of nuclear photosynthesis gene regulation by redox signals from the chloroplast during photosystem stoichiometry adjustment. *J Biol Chem* 2001; **276**: 36125-36130.
- [25] RODERMEL S. Pathways of plastid-to-nucleus signalling. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 471-478.
- [26] STREATFIELD SJ, WEBER A, KINSMANN EA, HAUSLER LI, BEITTENMILLER D-P, KAISER WM, FLUGGE U-I, CHORY J. The phosphoenolpyruvate/phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development, and plastid-dependent nuclear gene expression. *Plant Cell* 1999; **11**: 1609-1621.
- [27] VINTI G, HILLS A, CAMPBELL S, BOWYER JR, MOCHIZUKI N, CHORY J, LOPEZ-JUEZ E. Interactions between *hy 1* and *gun* mutants of *Arabidopsis* and their implications for plastid/nuclear signalling. *Plant J* 2000; **24**: 883-893.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 19.03.2002 r.

Przyjęto: 20.05.2002 r.

Adres autora: 61-713 Poznań, Al. Niepodległości 14  
grzesiek@main.amu.edu.pl





## PREZENTACJA ANTYGENU W MÓZGU\*

### ANTIGEN PRESENTATION IN THE BRAIN

Michał ŚLĘZAK

Zakład Neuroanatomii, Instytut Zoologii, UJ, Kraków

**Streszczenie:** Mózg był uważany za organ uprzywilejowany immunologicznie. Pogląd ten podważyło m.in. odkrycie, że wewnątrz CNS dochodzi do prezentacji antygenów. Nie jest dokładnie wiadomo, które z endogennych komórek mózgu odpowiedzialne są za ten proces. Eksperymenty skupiają się na wykazaniu ekspresji MHCII i kostymulatorów na powierzchni tych komórek oraz ich zdolności do aktywowania limfocytów T. W pracy omówiono badania dotyczące roli komórek gwałgowych – astrocytów, mikrogleju, a także śródbłonna i makrofagów okołonaczyniowych – w prezentacji antygenów w mózgu.

**Słowa kluczowe:** prezentacja antygenów, astrocyty, mikroglej, makrofagi

**Summary:** The brain was considered as the immune-privileged organ. This view has been shaken, among others, by the discovery, that the antigen presentation takes place inside the CNS. It is not known precisely, which of endogenous cells of the brain are responsible for this process. Experiments concentrate on expression of MHCII and costimulatory molecules on the surface of these cells, as well as on their capability to stimulate T-lymphocyte activation. In this paper, studies concerning the role of glial cells – astrocytes, microglia, and also endothelium and perivascular macrophages – in antigen presentation in the brain are reviewed.

**Keywords:** antigen presentation, astrocytes, microglia, macrophages

**Skróty:** APC (*antigen presenting cell*) – komórka prezentująca antygen; BBB (*blood-brain barrier*) – bariera krew-mózg; CNS (*central nervous system*) – centralny układ nerwowy; CSF (*colony stimulating factor*) – czynnik stymulujący wzrost kolonii; EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*) – doświadczalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu i rdzenia; FGF (*fibroblast growth factor*) – czynnik wzrostu fibroblastów; GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) – kwaśne włóknkowe białko gwałgowe; ICAM (*intercellular cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej; IFN – interferon; IL – interleukina; LFA (*lymphocyte function associated antigen*) – antygen związany z czynnością limfocytów; LPS – lipopolisacharyd; MBP (*myelin basic protein*) – zasadowe białko mieliny; MHC

\*Praca dofinansowana grantem KBN numer 4P05A 10117.

(*major histocompatibility complex*) – główny kompleks zgodności tkankowej; **MS** (*multiple sclerosis*) – stwardnienie rozsiane; **PDGF** (*platelet derived growth factor*) – płytkopochodny czynnik wzrostowy; **TCR** – receptor limfocyту T; **TGF** (*transforming growth factor*) – transformujący czynnik wzrostowy; **TNF** (*tumour necrosis factor*) – czynnik nekrozy nowotworu; **TNFR** – receptor dla TNF; **Th** (*T helper*) – podklasa limfocytów T pomocniczych; **Tc** (*T cytotoxic*) – podklasa limfocytów T cytotoksycznych; **VCAM** (*vascular cell adhesion molecule*) – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń; **VLA** (*very late activation antigen*) – antygen bardzo późno aktywowany.

W organizmie wyróżniano tradycyjnie kilka miejsc uprzywilejowanych immunologicznie, czyli takich, które nie mają kontaktu z komórkami immunokompetentnymi. Zaliczano do nich także mózg. Pogląd ten został jednak zakwestionowany, gdy wykazano obecność reaktywnych limfocytów T w obrębie CNS oraz opisano przebieg i cechy charakterystyczne reakcji odpornościowej w mózgu. Szczegółowe poznanie tej reakcji może mieć kluczowe znaczenie w zrozumieniu mechanizmów powstawania i terapii wielu schorzeń neurologicznych, m.in. stwardnienia rozsianego, udaru mózgu oraz chorób neurodegeneracyjnych [18,57]. Jednym z najważniejszych etapów reakcji odpornościowej jest prezentacja antygeny. Badania nad tym procesem w mózgu mają podstawowe znaczenie w wyjaśnieniu mechanizmów inicjacji reakcji obronnej mózgu, jak również patogenezy schorzeń autoimmunizacyjnych. Najważniejszym z nich jest stwardnienie rozsiane (MS) i jego zwierzęcy model – EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*). Chorobę wywołują autoreaktywne limfocyty T, rozpoznające zasadowe białko mieliny (MBP) jako obce. Reaktywne limfocyty T CD4+ napływają przez nietkniętą barierę krew-mózg, następnie wywołują uszkodzenia neuronów, co z kolei prowadzi do napływu makrofagów i kolejnych limfocytów T, już po przerwaniu bariery krew-mózg. W efekcie komórki układu odpornościowego niszczą tkankę nerwową, prowadząc do stopniowego zaniku czynności motorycznych, narastającego paraliżu i śmierci [5].

## 1. REAKCJA ODPORNOŚCIOWA W MÓZGU

Specyfika reakcji odpornościowej w mózgu ma związek z obecnością bariery krew-mózg (BBB – *blood-brain barrier*), brakiem naczyń limfatycznych w tkance nerwowej i silnie immunosupresyjnym środowiskiem.

Jako bariera krew-mózg określane jest zespół mechanizmów izolujących od siebie obie te tkanki, jak również umożliwiających i kontrolujących ich wzajemny kontakt. Fizycznie bariera jest zbudowana z śródbłónką, który w mózgu, w odróżnieniu od innych organów, tworzy ścisłe połączenia międzykomórkowe (*tight junctions*) oraz astrocytów otaczających swymi „stopkami” naczynia krwionośne. Cechą charakterystyczną BBB jest też niewielka ilość cząsteczek adhezyjnych na powierzchni śródbłónki, co uniemożliwia kontakt komórek krwi z wnętrzem mózgu, a w szczególności ich napływ w obręb CNS [44]. W normalnych warunkach mechanizmy te chronią układ nerwowy przed kontaktem z elementami układu odpornościowego. W stanach patologicznych, takich jak: udary, uszkodzenia mechaniczne, infekcje wirusowe, choroby neurodegeneracyjne – następuje przerwanie bariery.

Po uszkodzeniu mózgu dochodzi do reakcji obronnej, kontrolowanej przez endogenne komórki tkanki mózgowej. Przerwanie bariery krew-mózg oraz uwalnianie PDGF i TGF $\beta$  z uszkodzonych płytek krwi powoduje napływ makrofagów. Są one odpowiedzialne za usunięcie szczątków obumarłych komórek. Chociaż na obwodzie napływ makrofagów wydaje się być niezbędny do regeneracji aksonów, to w CNS nie wywołują one takiego efektu. Makrofagi wydzielają cytokiny prozapalne oraz chemokiny będące sygnałem do napływu limfocytów. Wydzielany przez makrofagi FGF wywołuje napływ fibroblastów, których cytokiny z kolei stymulują wzrost ekspresji GFAP w astrocytach i proliferację tych komórek. Proces ten jest określany mianem reaktywnej astroglejozy [33]. Efektem jest utworzenie się blizny glejowej, której głównym składnikiem są astrocyty. Blizna glejowa umożliwia oddzielenie mas martwiczych od zdrowego neuropilu oraz odbudowanie bariery krew-mózg. Jej negatywnym skutkiem jest hamowanie regeneracji uszkodzonych aksonów przez pewne proteoglikany na powierzchni astrocytów [40].

Inną charakterystyczną cechą odpowiedzi immunologicznej w mózgu jest aktywacja mikrogleju – makrofagów rezydujących w mózgu. Dochodzi do proliferacji tych komórek i przejścia ze stanu spoczynkowego w postać aktywną [58].

W CNS zdecydowanie mniejszy niż w innych tkankach jest napływ limfocytów, co może być spowodowane brakiem wystarczającej ilości chemoatraktantów, cząsteczek adhezyjnych lub immunosupresyjnym wpływem środowiska CNS [44]. Zarówno reaktywne astrocyty, jak i mikroglej kontrolują przebieg reakcji odpornościowej przez wydzielanie cytokin i ekspresję białek adhezyjnych [4,6].

Niezwykle istotną rolę w odpowiedzi obronnej mózgu odgrywają cytokiny. Te biologicznie aktywne substancje o plejotropowym działaniu są wydzielane przez wszystkie komórki obecne w rejonie zapalenia. Każda z cytokin wywiera swój wpływ na przebieg procesu zapalnego, a o aktualnej sytuacji decyduje poziom wszystkich cytokin w danej chwili. Stąd trudno ocenić wpływ wyeliminowania czy podwyższonego poziomu pojedynczej cytokiny, a właściwe wydaje się badanie molekularnych podstaw działania i jak najszerzych współzależności w całej sieci cytokin [11]. W kontekście prezentacji antygeny szczególne znaczenie ma IFN $\gamma$ . Cytokina ta należy do najważniejszych cytokin immunoregulacyjnych. Jest produkowana przez aktywowane limfocyty T i stymuluje odpowiedź komórkową, poprzez wzmacnianie produkcji cytokin prozapalnych w komórkach docelowych oraz wpływ na różnicowanie Th w stronę Th1. Stwierdzono, iż IFN $\gamma$  podnosi lub indukuje *in vitro* ekspresję MHCII na wielu rodzajach komórek – makrofagach, komórkach dendrytycznych, limfocytach B, mikrogleju, astrocytach, oligodendrocytach, śródbłonku [8, 54].

## 2. PREZENTACJA ANTYGENU

Proces prezentacji antygeny jest jednym z kluczowych momentów inicjacji odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko określonemu antygenowi. Polega na przedstawieniu limfocytowi T fragmentu białka połączonego z cząsteczką MHC klasy

II. Komórka prezentująca antygen (APC) najpierw fagocytuje białko, następnie rozkłada je na mniejsze fragmenty, które łączą się z MHCII w obrębie siateczki śródplazmatycznej, po czym następuje transport takiego kompleksu na powierzchnię APC. W takiej formie jest on rozpoznawany przez receptor limfocytów T (TCR), a także przez specyficzny dla limfocytów pomocniczych antygen CD4 [25]. Efektem całego procesu jest aktywacja limfocyta T, swoistego dla prezentowanego antygeny. W czasie prezentacji antygeny zarówno APC, jak i limfocyt T wydzielają cytokiny. APC wydziela IL-4 i IL-10, jeśli odpowiedź ma przebiegać w kierunku odpowiedzi humoralnej (Th2), lub IL-2 i IL-12, jeśli ma dojść do odpowiedzi komórkowej (Th1). Cytokiny pobudzające Th1 są przez te komórki również wydzielane i wpływają hamująco na podgrupę Th2, podobnie – cytokiny Th2 hamują rozwój Th1. Natomiast limfocyt T wydziela IFN $\gamma$ , GM-CSF, IL-4 odpowiedzialne między innymi za podtrzymanie ekspresji cząsteczek adhezyjnych na APC [48].

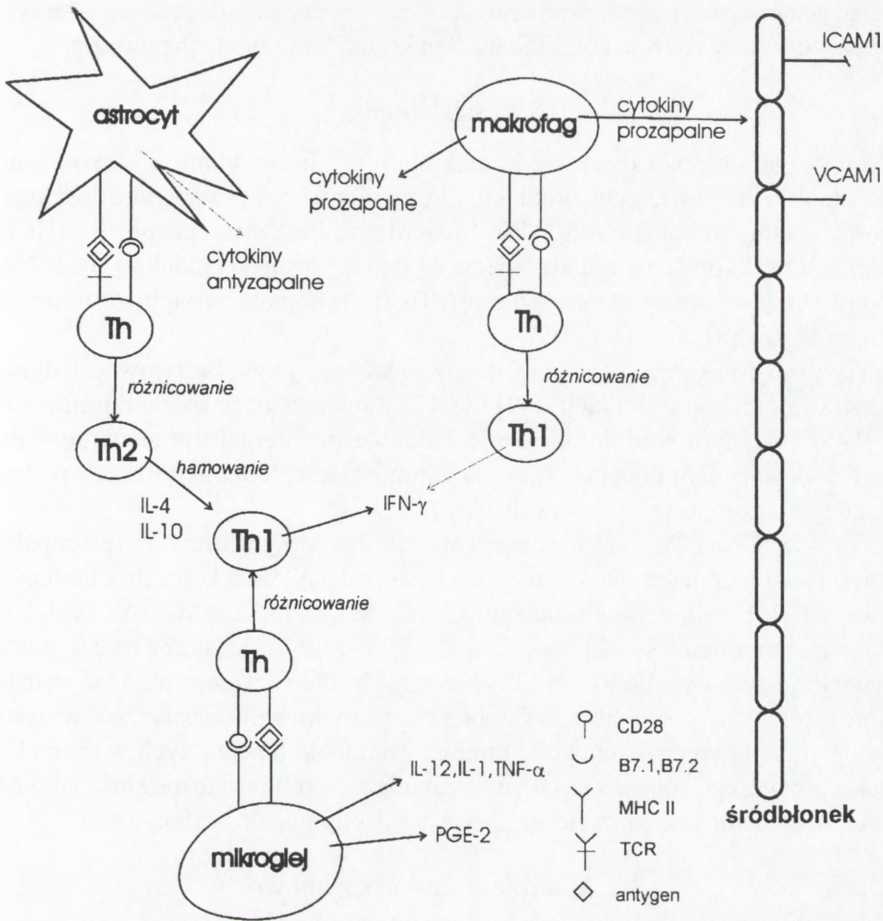
Wśród APC można wyróżnić takie, które zdolne są zaktywować naiwne limfocyty T (tzw. *priming* – stymulacja antygenem), oraz takie, które aktywują tylko te limfocyty, które wcześniej miały zaprezentowany antygen w jednym z obwodowych narządów limfatycznych (reaktywacja). Prawdopodobnie do pierwszej grupy należą wyłącznie komórki dendrytyczne, natomiast reszta komórek prezentujących antygen – makrofagi, limfocyty B i inne – może tylko reaktywować limfocyty T [46].

Do pełnej aktywacji limfocyta T oprócz oddziaływania MHCII-TCR, pozwalającego na selekcję limfocytów swoistych dla danego antygeny konieczny jest drugi sygnał. Pochodzi on od cząsteczek kostymulujących obecnych na powierzchni APC. Oddziaływanie MHCII-TCR uruchamia szlak przekazu sygnału do wnętrza obu komórek, a do najważniejszych konsekwencji należy produkcja IL-2 – stymulującej proliferację i różnicowanie komórki T – przez APC, wzmocnienie ekspresji antygeny CD40 (na APC) oraz indukcja ekspresji CD40L (na limfocycie T). Oddziaływanie tych cząsteczek stymuluje produkcję antygenów z grupy B.7, będących najważniejszymi kostymulatorami [26]. Jeśli limfocyt T rozpozna antygen na powierzchni APC, ale nie dojdzie do kostymulacji, to ulega anergii.

Aby zaliczyć komórkę do grupy APC, należy więc dowieść obecności na jej powierzchni MHCII, cząsteczek kostymulujących, a także ocenić jej zdolność do indukowania aktywacji i proliferacji limfocytów T.

### 3. KOMÓRKI PREZENTUJĄCE ANTYGENY W MÓZGU

Dopiero w latach osiemdziesiątych udało się wykazać, że aktywne limfocyty T (po zaprezentowaniu im antygeny w jednym z obwodowych narządów limfatycznych) mogą swobodnie przekraczać barierę krew-mózg i jest to uzależnione jedynie od stanu aktywacji limfocyta [55]. Inne eksperymenty pokazały, że do prezentacji antygeny dochodzi również w obrębie tkanki nerwowej. W jednym z nich zwierzętom ze



RYCINA 1. Schemat prawdopodobnych zależności między komórkami prezentującymi antygen w CNS

zmienionym szpikiem kostnym (chimerom) podano limfocyty CD4+ swoiste dla białek mieliny, zgodne pod względem MHCII z komórkami rezydującymi w CNS, ale niezgodne z MHCII komórek szpikopochodnych. Takie limfocyty wywoływały EAE [41]. W innym eksperymencie zwierzętom podano aktywne limfocyty T swoiste dla antygenów neuronalnych zgodnych z MHCII gospodarza, swoiste dla antygenów nie występujących w mózgu, ale zgodne z MHCII gospodarza oraz swoiste dla MBP, ale niezgodne z MHCII gospodarza. Wszystkie grupy znaleziono w obrębie CNS po upływie 9–12 h, ale po 48 h pozostały tylko limfocyty swoiste dla MBP i zgodne z MHCII gospodarza [30]. Oba doświadczenia świadczą o tym, że musiało dojść do prezentacji antygeny wewnątrz CNS.

Wnikające do mózgu limfocyty T napotykać na swojej drodze kolejno: komórki śródbłonnka naczyń krwionośnych, okołonaczyniowe makrofagi/mikroglej, a w parenchymie astrocyty, neurony, oligodendrocyty oraz mikroglej. Poniżej przedstawiono

przegląd doświadczeń mających na celu sprawdzenie zdolności do prezentacji antygeny przez poszczególne rodzaje komórek według kryteriów przyjętych powyżej.

### 3.1. Śródbłonek

Komórki śródbłonna pierwsze kontaktują się z limfocytami T. Jako komórki graniczne, o dużej powierzchni kontaktu z komórkami krwi i swobodnie dostępne dla komórek T mogłyby pełnić rolę APC. Stwierdzono brak stałej ekspresji MHCII na komórkach śródbłonna, natomiast *in vitro* występuje ekspresja indukowana IFN $\gamma$  lub TNF $\alpha$  [8,16]. *In vivo* zauważono ekspresję MHCII, ale dopiero po napływie limfocytów T i makrofagów [8].

Sprawdzając ekspresję kostymulatorów udało się ją zaobserwować jedynie w kulturze komórek, po stymulacji IFN $\gamma$  [28,47]. Zauważono, że kontakt limfocytów T z B7.1-pozytywnym śródbłonkiem nie indukuje proliferacji, przeciwnie – może prowadzić do anergii limfocyta [47]. *In vitro* komórki śródbłonna aktywowały podgrupę Th2, ale tylko częściowo aktywowały Th1 [28].

Podczas zapalenia wielokrotnie obserwowano – pod wpływem cytokin prozapalnych wydzielanych przez makrofagi i astrocyty, a także pod wpływem kontaktu z limfocytami T – wzrost ekspresji cząstek adhezyjnych (CAM), m.in. ICAM-1, VCAM-1 oraz selektyn na komórkach śródbłonna. Cząsteczki te odgrywają istotną rolę w procesie napływu limfocytów w obręb CNS [35]. Komórki śródbłonna mogą również wydzielać niektóre cytokiny. To potwierdza, że śródbłonek bierze aktywny udział przede wszystkim w regulacji napływu egzogennych komórek immunokompetentnych w obręb CNS. Jednak z powyższych obserwacji wynika również, że komórki te nie służą jako APC, a nawet mogą hamować specyficzną antygenowo odpowiedź limfocytów T.

### 3.2. Makrofagi okołonaczyniowe

Kolejnym etapem na drodze napływających komórek T jest przestrzeń okołonaczyniowa, w której obecne są makrofagi i mikroglej okołonaczyniowy. Te dwie grupy komórek w tym obszarze są do siebie podobne pod względem fenotypu, a różnią się położeniem, jako że mikroglej nie jest przykryty błoną naczyniową. Podczas zapalenia w CNS makrofagi fagocytują szczątki komórek, a po interakcji z napływającymi limfocytami T produkują różne cytokiny i chemokiny kontrolujące wejście odpowiednich komórek immunokompetentnych w obszar CNS – pełnią więc rolę strażników (*gatekeepers*) [44]. Cytokiny prozapalne produkowane przez makrofagi (m.in. TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6) aktywują też komórki glejowe, na których zmienia się ekspresja CAM i skład wydzielanych cytokin [29]. W obrębie CNS można wyróżnić kilka podgrup makrofagów różniących się lokalizacją, morfologią, immunofenotypem: makrofagi okołonaczyniowe, oponowe, spłotu naczyniówkowego i inne [46]. Jako APC mogą służyć głównie te, z którymi napływające limfocyty mają kontakt w trakcie wchodzenia do CNS, czyli makrofagi okołonaczyniowe.

Makrofagi okołonaczyniowe prowadzą aktywną fagocytozę. Znalaziono także na nich stałą ekspresję MHCII, której poziom wzrasta po uszkodzeniu mózgu [46] oraz

pod wpływem IFN $\gamma$  [29]. Stwierdzono stałą ekspresję kostymulatorów B7.1, B7.2, której poziom wzrasta w przypadku stwardnienia rozsianego [19]. Limfocyty T swoiste dla MBP po kontakcie z okołonaczyniowymi makrofagami proliferują oraz wydzielają cytokiny prozapalne [24]. Zaraz po izolacji z mózgu makrofagi są zdolne zainicjować proliferację limfocytów T i ich różnicowanie się w kierunku Th1. Uważa się je także za zaangażowane w reaktywację komórek CD4+ [1]. Po unieczynnieniu makrofagów limfocyty T pozostają w przestrzeni okołonaczyniowej, co może świadczyć o braku prezentacji antygeny tym komórkom [44].

W chwili obecnej większość badaczy zgadza się z poglądem, że makrofagi okołonaczyniowe są głównymi APC w CNS [4,8,16,28,46].

### 3.3. Mikroglej

Komórkami odpowiedzialnymi za funkcje odpornościowe w parenchymie mózgu są komórki mikrogleju. Pochodzą z linii fagocytów jednojądrzastych [29], ale w porównaniu z makrofagami mają znacznie zredukowany fenotyp – niską ekspresję MHCII, CD4 i CD45, brak ekspresji ED1 [22, 34].

Już pierwsze eksperymenty sprawdzające obecność MHCII w mózgu pokazały, że antygen ten występuje na komórkach mikrogleju, choć w niewielkiej ilości, co potwierdziły też późniejsze badania. Istotne znaczenie ma wiek i stan badanych zwierząt. U młodych, zdrowych szczurów praktycznie brak stałej ekspresji MHCII na mikrogleju. Pojawia się ona u zdrowych, ale starszych zwierząt, jak również u zwierząt w różnym wieku ze zmianami patologicznymi w mózgu [50]. Sprawę komplikuje fakt występowania różnic międzygatunkowych, jako że stałą ekspresję MHC II można wykazać u człowieka już w życiu płodowym [56], natomiast nie zawsze u gryzoni [16]. Ekspresja MHCII na mikrogleju znacznie wzrasta po zadziałaniu czynników aktywujących, m.in.: IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , w trakcie zwyrodnienia Wallera oraz podczas wielu schorzeń, np. niedokrwienia lub EAE [24, 34].

Istnieją prawdopodobnie precyzyjne mechanizmy regulujące poziom MHCII na mikrogleju [37]. Jego niski poziom w zdrowej tkance wynika zarówno z braku bodźców stymulujących, jak również obecności czynników hamujących ekspresję. Za czynniki obniżające poziom MHCII uważa się kontakt komórkowy oraz substancje rozpuszczalne obecne w surowicy. Taki rozpuszczalny związek mógłby działać np. przez zmianę stężenia jonów, stwierdzono bowiem wzrost poziomu MHCII po zablokowaniu kanałów jonowych dla Na<sup>+</sup> [46].

W niezmięnionej patologicznie tkance mózgu człowieka występuje stała ekspresja B7.2, a antygen B7.1 pojawia się po aktywacji mikrogleju [19]. U gryzoni nie stwierdzono obecności kostymulatorów na mikrogleju spoczynkowym w zdrowym mózgu, jednak obserwuje się wzrost poziomu tych antygenów po zadziałaniu czynników stymulujących, na powierzchni aktywnego mikrogleju [10]. Znalaziono skupiska komórek mikrogleju i limfocytów T [23], co świadczy o tym, że dochodzi między nimi do bezpośredniego kontaktu. Komórki mikrogleju pobrane z mózgu młodej myszy wykazywały ekspresję ICAM-1, CD40, B7.2 oraz zostały pobudzone przez IFN $\gamma$  do

ekspresji MHCII, a mimo tego nie były zdolne wywołać proliferacji naiwnych limfocytów T. Natomiast komórki mikrogleju pochodzące z mieszanej hodowli glejowej działały jako efektywne APC [12]. Może to świadczyć o kontrolowaniu aktywacji mikrogleju przez astrocyty. Kierunek różnicowania limfocyta T po jego oddziaływaniu z komórkami mikrogleju może zależeć od historii aktywacji tych ostatnich. Wykazano, że mikroglej aktywowany cytokinami supresyjnymi wpływa na różnicowanie komórek T w kierunku Th2, natomiast po aktywacji mikrogleju cytokinami prozapalnymi, np. IFN $\gamma$  komórki te indukują odpowiedź Th1 [38].

W badaniach Bechera [8] porównano zdolność aktywacji limfocytów T przez makrofagi i mikroglej. Okołonaczyniowe makrofagi/mikroglej znacznie silniej stymulują limfocyty T swoiste dla MBP niż mikroglej parenchymalny. Ma to prawdopodobnie związek z antygenem CD45. Jego poziom jest wysoki na komórkach okołonaczyniowych, natomiast niski na mikrogleju parenchymalnym. Mikroglej o fenotypie CD45<sup>low</sup> dopiero po kontakcie z limfocytym T uzyskuje fenotyp CD45<sup>high</sup> i zdolność do jego pełnej aktywacji [23].

Choć część badaczy zalicza mikroglej do komórek prezentujących antygen i stymulujących w pełni limfocyty T [14], to jednak prawdopodobnie nie stymuluje on komórek T w typowy sposób. Powoduje zwiększenie ich rozmiarów oraz ekspresję niektórych cząsteczek, np.: IL-2R, OX40, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , ale nie stymuluje ich proliferacji. Interakcja mikrogleju z limfocytym T może nawet prowadzić do apoptozy limfocyta [23]. Mikroglej należałoby więc uznać za komórki, które chronią tkankę nerwową przed nadmierną reaktywnością limfocytów T, lecz mogą również podtrzymywać zainicjowaną wcześniej odpowiedź odpornościową.

### 3.4. Astrocyty

Astrocyty są najliczniejszą subpopulacją komórek glejowych. Pełnią wiele funkcji fizjologicznych w CNS, m.in.: współtworzą barierę krew- mózg; utrzymują stałe stężenie jonów w środowisku; są zdolne do magazynowania glukozy i udostępnienia jej neuronom w razie potrzeby; metabolizują większość neuroprzekazników oraz niektóre toksyny [43]. Odgrywają również istotną rolę w stanach patologicznych mózgu [20].

Na możliwość prezentacji antygeny przez astrocyty wskazały eksperymenty *in vitro*, w których stwierdzono indukowaną IFN $\gamma$  ekspresję MHCII na ich powierzchni [21]. Astrocyty nie wykazują stałej ekspresji MHCII [39]. W badaniach *in vitro* można wyindukować ekspresję MHCII stosując IFN $\gamma$  lub cząsteczki wirusowe [2]. Eksperymenty *in vivo* dają sprzeczne wyniki. Obecność MHCII na astrocytach po podaniu IFN $\gamma$  stwierdzili Vass i Lassmann [54], obserwowano ją także w stanach patologicznych, np. stwardnieniu rozsianym [57]. Natomiast eksperyment Horwitza [31] przeczy tym wynikom. W doświadczeniu tym użyto mózgow z normalnych myszy oraz z myszy tak zmienionych genetycznie, by wzmożona ekspresja IFN $\gamma$  nastąpiła w 8 tygodniu życia. Stosując podwójne barwienia na charakterystyczne markery wszystkich typów komórek występujących w CNS oraz na MHCI i na MHCII wykazano, że kolokalizacja tych antygenów występuje na śródbłonku, mikrogleju i oligodendrocytach,



ale nie na neuronach ani astrocytach. Horwitz polemizuje z wynikami potwierdzającymi obecność MHCII na astrocytach *in vivo* (prowadzonych w większości na mózгах z chorobami neurodegeneracyjnymi) sugerując, że jest to możliwe przy udziale mikrogleju i odpowiednich cytokin, ale jedynie w obecności uszkodzonych neuronów.

Istnieją również sprzeczne dane dotyczące istotnych w prezentacji antygenów cząsteczek adhezyjnych na astrocytach. Według jednych badaczy ICAM-1 występuje na powierzchni astrocytów w sposób stały [29], według innych – tylko indukowalny, na reaktywnych astrocytach [15,16]. W odpowiedzi na różne bodźce, np. IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , LPS wzmacniana jest ekspresja ICAM-1, VCAM-1 oraz E-selektyn. Inna cząsteczka, CD45, istotna w utrzymaniu adhezji w trakcie prezentacji antygenów, także jest obecna na reaktywnych astrocytach [15].

Wyniki doświadczeń sprawdzających obecność kostymulatorów B7.1 i B7.2 nie są zgodne. U człowieka te kostymulatory nie występują na powierzchni astrocytów, nawet po traktowaniu IFN $\gamma$  [49]. U gryzoni *in vitro* wykazano stałą ekspresję B7.2, a po traktowaniu IFN $\gamma$  ekspresję B7.1 oraz wzrost poziomu B7.2 [42]. W innych doświadczeniach stwierdzono obecność obu kostymulatorów po stymulacji IFN $\gamma$  [52] lub w tych samych warunkach nie zaobserwowano pojawienia się tych antygenów [3]. W eksperymentach *in vivo* u zwierząt z EAE wykazano ekspresję B7.2 na astrocytach [32] lub jej brak [17]. Sugeruje się, że obecność B7.1 i/lub B7.2 na astrocytach determinuje stopień aktywacji limfocyta T [52].

Na temat zdolności astrocytów do aktywowania napływających do mózgu limfocytów T istnieją różne poglądy. W kilku doświadczeniach wykazano, że tylko astrocyty traktowane IFN $\gamma$  mogą stymulować proliferację limfocytów T swoistych dla MBP [15,21,51]. Ostatnie badania pokazały, że astrocyty preaktywowane IFN $\gamma$  nie tylko aktywują limfocyty T, ale też są zdolne indukować proliferację naiwnych komórek T, co ma bezpośredni związek z ekspresją kostymulatora B7.2 [42] i B7.1 [53]. W warunkach *in vitro* pokazano, że astrocyty po preaktywacji IFN $\gamma$  indukują proliferację limfocytów CD4 $^{+}$ , a aktywować limfocyty CD8 $^{+}$  mogą nawet bez traktowania IFN $\gamma$  [15]. Te wyniki wskazują, że astrocyty są zdolne do wywołania odpowiedzi komórkowej.

Zaobserwowano także jednak, że limfocyty aktywowane przez astrocyty różnicują się w kierunku Th2 [2]. Biorąc pod uwagę, że głównymi komórkami odpowiedzialnymi za inicjację EAE są limfocyty Th1, sugerowałoby to protekcyjną rolę astrocytów. Zgadza się to z faktem, że są one głównym źródłem jednej z cytokin antyzapalnych – TGF $\beta$ , pod wpływem której spada poziom ekspresji MHCII, ICAM-1 oraz dochodzi do supresji bądź apoptozy napływających limfocytów T [2]. Znalezione też czynniki pochodzenia astrocytarnego, deaktywujący komórki prezentujące antygen, które weszły w obręb CNS [27]. Z drugiej strony odkryto limfocyty CD4 $^{+}$ , które działają cytotoksycznie na MHCII – pozytywne astrocyty. Może to świadczyć o wytworzonym mechanizmie obronnym tych limfocytów przeciw komórkom mogącym hamować proces zapalny.

Podsumowując można stwierdzić, że astrocyty oprócz swej roli w inicjacji odpowiedzi zapalnej przez produkcję cytokin prozapalnych [6], mają istotny udział w jej regulacji. Jest bardzo prawdopodobne, że napływające limfocyty T wchodzą w interakcje

z astrocytami. Nie dochodzi raczej jednak do klasycznej prezentacji antygeny i pełnej aktywacji limfocytów T, lecz do częściowej aktywacji limfocytów lub przeciwnie – do ich anergii, a może nawet apoptozy.

#### 4. IMMUNOSUPRESYJNE ŚRODOWISKO MÓZGU

Mózg – uważany wcześniej za rejon uprzywilejowanym immunologicznie – okazał się organem precyzyjnie kontrolującym aktywność komórek immunokompetentnych [13]. Dochodzi tu przede wszystkim do hamowania odpowiedzi obronnej przy pomocy różnorodnych mechanizmów.

Jednym z nich jest produkcja czynników immunosupresyjnych, głównie hamujących cytokin. Astrocyty produkują  $TGF\beta$ , jak również inne czynniki supresyjne, których działanie opisano powyżej. Mikroglej jest źródłem prostaglandyny E<sub>2</sub>. Związek ten powoduje spadek poziomu kostymulatorów oraz MHCII, hamuje proliferację limfocytów T oraz wpływa na ich różnicowanie się w kierunku Th2 [36]. Inne czynniki obniżające poziom MHCII w mózgu to wydzielane przez makrofagi CSF-1 [37], a także IL-10 [24]. Właśnie wpływ środowiska supresyjnego na napływające limfocyty T wydaje się najistotniejszy w hamowaniu odpowiedzi obronnej.

Innym mechanizmem obronnym mózgu jest indukowanie apoptozy komórek T. Dowiedziono, że dochodzi do niezależnej od antygeny apoptozy większości reaktywnych limfocytów T napływających do mózgu. Proces ten ma miejsce głównie w parenchymie, i w znacznie mniejszym stopniu w przestrzeni okołonaczyniowej oraz w oponach mózgu [7], a jest wywołany kontaktem limfocytów T z astrocytami i komórkami mikrogleju. Inicjacja apoptozy może się odbyć przez związanie antygeny Fas na powierzchni limfocyty T z FasL na powierzchni mikrogleju – jest to podstawowy mechanizm wywołujący apoptozę. Stała ekspresja FasL na endogennych komórkach CNS jest istotnym elementem bariery immunologicznej ochraniającej ten organ przed napływającymi limfocytami T [9]. Inny mechanizm apoptozy wykorzystuje receptor TNFR1 [45]. Apoptozę może także wywołać  $TGF\beta$ , co wykazano w badaniach *in vitro*. Kolejnym związkiem wywołującym apoptozę limfocytów T są steroidy. Ilość glukokortykoidów wzrasta gwałtownie w obrębie CNS w okresie najintensywniejszej apoptozy komórek T w czasie EAE. Za apoptozę limfocytów T mogą być także odpowiedzialne gangliozydy, dzięki zdolności wiązania się do receptora IL-2, co jest sygnałem hamującym dla limfocyty i zwiększa jego podatność na sygnały apoptozy [7].

## 5. PODSUMOWANIE

Po uszkodzeniu mózgu dochodzi do reakcji odpornościowej kontrolowanej przez endogenne komórki CNS. Cytokiny przez nie wydzielane powodują napływ limfocytów T. Kierunek reakcji odpornościowej zależy od stymulacji napływających limfocytów. Jeśli zostanie im zaprezentowany antygen, w procesie z udziałem makrofagów lub aktywnego mikrogleju, może dojść do cytotoksycznej reakcji limfocytów T. Jeśli jednak limfocyt wejdzie w interakcję z astrocytami lub nieaktywnym mikroglejem, dojdzie prawdopodobnie do jego anergii, a być może apoptozy.

Wiadomo, że większość limfocytów biorących udział w odpowiedzi odpornościowej ulega apoptozie [7,45], natomiast nie do końca znane są losy pozostałych komórek immunokompetentnych. Makrofagi okołonaczyniowe podlegają prawdopodobnie wymianie w okresie kilku miesięcy [30]. Natomiast reaktywne astrocyty i mikroglej po wykonaniu swych zadań być może także ulegają apoptozie, ale możliwy jest także ich powrót do stanu spoczynkowego.

Badania nad kontrolą odpowiedzi obronnej mózgu pozostają trudnym wyzwaniem, ze względu na udział wielu typów komórek oraz wydzielanych przez nie czynników, z których same cytokiny tworzą skomplikowaną sieć wzajemnych zależności. Poznanie tych mechanizmów może mieć istotne znaczenie dla znalezienia efektywnych sposobów leczenia wielu schorzeń mózgu.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] ALOISI F, RIA F, COLUMBA-CABEZAS S, HESS H, PENNA G, ADORINI L. Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells priming and Th1/Th2 cell restimulation. *Eur J Immunol* 1999; **29**: 2705-2714.
- [2] ALOISI F, RIA F, ADORINI L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today* 2000; **21**: 141-147.
- [3] ALOISI F, SERAFINI B, ADORINI L. Glia – T cell dialogue. *J Neuroimmunol* 2000; **107**: 111–117.
- [4] ALOISI F. Immune function of microglia. *Glia* 2001; **36**: 165-179.
- [5] ANTEL J, OWENS T. Immune regulation and CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol* 1999; **100**: 181-189.
- [6] ASCHNER M. Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. *Neurotoxicology* 1998; **19**: 269-282.
- [7] BAUER J, BRADL M, HICKEY WF, FORSS-PETTER S, BREITSCHOPF H, LININGTON C, WEKERLE H, LASSMANN H. T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions. *Am J Pathol* 1998; **153**: 715-724.
- [8] BECHER B, PRAT A, ANTEL JP. Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* 2000; **29**: 293–304.
- [9] BECHMANN I, MOR G, NILSEN J, ELIZA M, NITSCH R, NAFTOLIN F. FasL (CD59L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological barrier. *Glia* 1999; **27**: 62-74.
- [10] BECHMANN I, PETER S, BEYER M, GIMSA U, NITSCH R. Presence of B7-2 (CD86) and lack of B7-1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity *in vivo*. *FASEB J* 2001; **6**: 1086-1088.
- [11] BENVENISTE EN. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; **9**: 259-275.
- [12] CARSON MJ, REILLY C, SUTCLIFFE JG, LO D. Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia* 1998; **22**: 72-85.

- [13] CARSON MJ, SUTCLIFFE JG. Balancing function vs self-defense: the CNS as an active regulator of immune responses. *J Neurosci Res* 1999; **55**: 1-8.
- [14] CASH E, ROTT O. Microglial cells qualify as the stimulators of unprimed CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the central nervous system. *Clin Exp Immunol* 1994; **98**: 313-318.
- [15] CORNET A, BETELLI E, OUKKA M, CAMBOURIS C, AVELLANA-ADALID V, KOSMATOPOULOS K, LIBLAU R. Role of astrocytes in antigen presentation and naive T-cell activation. *J Neuroimmunol* 2000; **106**: 69-77.
- [16] COURAUD P-O. Interactions between lymphocytes, macrophages and central nervous system cells. *J Leukocyte Biol* 1994; **56**: 406-411.
- [17] CROSS AH, KU G. Astrocytes and central nervous system endothelial cells do not express B7.1 (CD80) or B7.2 (CD86) immunoreactivity during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2000; **110**: 76-82.
- [18] CZŁONKOWSKA A, GROMADZKA G. Związek czynników immunologicznych z etiopatogenezą i przebiegiem klinicznym udaru mózgu. *Neurol Neurochir Pol* 2000; **Supl. 3**: 13-26.
- [19] DANGOND F, WINDHAGEN A, GROVES C. J, HAFLER D. A. Constitutive expression of costimulatory molecules by human microglia and its relevance to CNS autoimmunity. *J Neuroimmunol* 1997; **76**: 132-138.
- [20] DONG Y, BENVENISTE E. Immune function of astrocytes. *Glia* 2001; **36**: 180-190.
- [21] FIERZ W, ENDLER B, RESKE K, WEKERLE H, FONTANA A. Astrocytes as antigen presenting cells. *J Immunol* 1985; **134**: 3785-3793.
- [22] FORD AL, GOODSALL AL, HICKEY WF, SEDGWICK JD. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct *ex vivo* antigen presentation to MBP-reactive CD4<sup>+</sup> T-cells compared. *J Immunol* 1995; **154**: 4309-4321.
- [23] FORD AL, FOULCHER E, LEMCKERT FA, SEDGWICK JD. Microglia induces CD4 T lymphocyte final effector function and death. *J Exp Med* 1996; **184**: 1737-1745.
- [24] FREI K, FONTANA A. Antigen presentation in the CNS. *Mol Psych* 1997; **2**: 96-98.
- [25] GRAKOU I, BROMLEY SK, SUMEN C, DAVIS MM, SHAW AS, ALLEN PM, DUSTIN ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 1999; **285**: 221-227.
- [26] GREWAL IS, FLAVELL RA. CD40 and CD154 in cell mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 1998; **16**: 111-135.
- [27] HAILER NP, HEPPNER FL, HAAS D, NITSCH R. Astrocytic factors deactivate antigen presenting cells that invade the central nervous system. *Brain Pathol* 1998; **8**: 459-474.
- [28] HART MH, FABRY Z. CNS antigen presentation. *Trends Neurosci* 1995; **18**: 475-481.
- [29] HICKEY WF. Leukocyte traffic in the CNS: the participants and their roles. *Immunology* 1999; **11**: 125-137.
- [30] HICKEY WF, HSU BL, KIMURA H. T-Lymphocyte entry into the CNS. *J Neurosci Res* 1991; **28**: 254-260.
- [31] HORWITZ MS, EVANS CF, KLIER FG, OLDSTONE MBA. Detailed *in vivo* analysis of IFN $\gamma$  induced MHC expression in CNS: astrocytes fail to express MHC I and II molecules. *Lab Invest* 1999; **79**: 235-242.
- [32] ISSAZEDEL S, NAVIKAS V, SCHAUB M, SAYEGH M, KHOURY S. Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis *in vivo*. *J Immunol* 1998; **161**: 1104-1112.
- [33] JANEZKO K. Reakcja astrocytów na mechaniczne uszkodzenie mózgu. Aktywność podziałowa i ekspresja białek cytoszkieletowych. Uniwersytet Jagielloński Kraków 1995.
- [34] KREUTZBERG GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996; **19**: 312-318.
- [35] KUBES P, WARD PA. Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response. *Brain Pathol* 2000; **10**: 127-135.
- [36] LEVI G, MINGHETTI L, ALOISI F. Regulation of prostanoid synthesis in microglial cells and effects of PGE-2 on microglial functions. *Biochimie* 1998; **80**: 899-904.
- [37] LODGE PA, SRIRAM S. Regulation of microglial activation by TGF- $\beta$ , IL-10 and CSF-1. *J Leukocyte Biol* 1996; **60**: 502-508.

- [38] MA N, STREILEIN JW. T cell immunity induced by allogeneic microglia in relation to neuronal retina transplantation. *J Immunol* 1999; **162**: 4482-4489.
- [39] MATSUMOTO Y, OHMORI K, FUJIWARA M. Immune regulation by brain cells in the central nervous system: microglia but not astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T cells under *in vivo*-mimicking conditions. *Immunology* 1992; **76**: 209-216.
- [40] McKEON RJ, JURYNEC MJ, BUCK CR. The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci* 1999; **19**: 10778-10788.
- [41] MYERS KJ, DOUGHERTY JP, RON Y. *In vivo* antigen presentation by both brain parenchymal cells and hematopoietic derived cells during the induction of EAE. *J Immunol* 1993; **151**: 2252-2260.
- [42] NIKCEVICH KM, GORDON KB, TAN L, HURST SD, KNOEFL JF, GARDINIER M, BARRETT TA, MILLER SD. IFN- $\gamma$  activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. *J Immunol* 1997; **158**: 614-621.
- [43] NORENBERG MD. Astrocytes: normal aspects and response to CNS injury. 1997, W: „Immunology of the Nervous System”, red. R.W. Keane, W.F. Hickey, Oxford University Press.
- [44] OWENS T, TRAN E, HASSAN-ZAHRAE M, KRAKOWSKI M. Immune-cell entry to the CNS – a focus for immunoregulation of EAE. *Res Immunol* 1998; **149**: 781-789.
- [45] PENDER MP, RIST MJ. Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia. *Glia* 2001; **36**: 137-144.
- [46] PERRY VH. A revised view of the central nervous system microenvironment and MHCII antigen presentation. *J Neuroimmunol* 1998; **90**: 113-121.
- [47] PRAT A, AL-ASMI A, DUQUETTE P, ANTEL JP. Lymphocyte migration and multiple sclerosis: relation with disease course and therapy. *Ann Neurol* 1999; **46**: 253-256.
- [48] RENGARAJAN J, SZABO SJ, GLIMCHER LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 2000; **21**: 479-483.
- [49] SATOH J-I, LEE YB, KIM SU. T-cell costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) are expressed in human microglia but not in astrocytes in culture. *Brain Res* 1995; **704**: 92-96.
- [50] SEDGWICK JD, SCHWENDER S, GREGERSEN R, DORRIAS R, TERMEULEN V. Resident macrophages (ramified microglia) of the adult brown Norway rat CNS are constitutively MHC II positive. *J Exp Med* 1993; **177**: 1145-1152.
- [51] SOOS JM, MORROW J, ASHLEY TA, SZENTE BE, BIKOFF EK, ZAMVIL SS. Astrocytes express elements of the class II endocytic pathway and process central nervous system autoantigen for presentation to encephalitogenic T cells. *J Immunol* 1998; **161**: 5959-5966.
- [52] SOOS JM, ASHLEY TA, MORROW J, PATARROY JC, SZENTE BE, ZAMVIL SS. Differential expression of B7 co-stimulatory molecules by astrocytes correlates with T cell activation and cytokine production. *Int Immunol* 1999; **11**: 1169-1179.
- [53] TAN L, GORDON KB, MUELLER JP, MATIS L.A, MILLER SD. Presentation of proteolipid protein epitopes and B7.1-dependent activation of encephalitogenic T-cells by IFN $\gamma$ -activated SJL/L astrocytes. *J Immunol* 1998; **160**: 4271-4279.
- [54] VASS K, LASSMANN H. Intrathecal application of IFN $\gamma$ . Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *Am J Pathol* 1990; **137**: 789-800.
- [55] WEKERLE H, LININGTON CH, LASSMANN H, MEYERMANN R. Cellular immune reactivity within the CNS. *Trends Neurosci* 1986; **9**: 271-277.
- [56] WIERZBA-BOBROWICZ T, SCHMIDT-SIDOR B, GWIAZDA E, LECHOWICZ W, KOSNO-KRUSZEWSKA E. Major histocompatibility complex class II expression in the frontal and temporal lobes in the human fetus during development. *Folia Neuropathol* 2000; **38**: 73-77.
- [57] ZEINSTRA E, WILCZAK N, STREEFLAND C, DE KEYSER J. Astrocytes in chronic active multiple sclerosis plaques express MHCII molecules. *Clin Neurosci Neuropathol* 2000; **11**: 89-91.
- [58] ZIAJA M, JANECKO K. Spatiotemporal patterns of microglial proliferation in rat brain injured at the postmitotic stage of postnatal development. *J Neurosci Res* 1999; **58**: 379-386.

Redaktor prowadzący – Jan Żeromski

Otrzymano: 06.02.2002 r.

Przyjęto: 05.06.2002 r.

Adres autora: 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6

1. The first step in the process of organizational change is to identify the need for change. This is often done through a SWOT analysis, which examines the organization's internal strengths and weaknesses, as well as its external opportunities and threats. Once the need for change is identified, the next step is to develop a clear vision and strategy for the change. This involves setting specific goals and objectives, and determining the resources and actions needed to achieve them. The third step is to communicate the vision and strategy to all employees, and to gain their buy-in and support. This is often done through a combination of formal communication channels, such as meetings and reports, and informal channels, such as one-on-one conversations and team discussions. The fourth step is to implement the change, which involves putting the strategy into action and monitoring progress. This is often done through a combination of formal mechanisms, such as performance metrics and reporting systems, and informal mechanisms, such as regular check-ins and feedback loops. Finally, the fifth step is to evaluate the results of the change and make adjustments as needed. This involves comparing the actual results to the expected results, and identifying any gaps or areas for improvement. The process of organizational change is a continuous one, and it is important to remain flexible and open to new ideas and approaches as the organization evolves.

Organizational change is a complex process that requires careful planning and execution. It is important to involve all employees in the process and to communicate the vision and strategy clearly. By following these steps, organizations can successfully implement change and improve their performance.

## Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (TIF, .PCX), albo pliki z Corela, wersja 5,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej. Rysunki, schematy zdjęcia i wykresy w podpisach i w powołaniach w tekście powinny nosić nazwę rycina (Ryc.) i być numerowane kolejno.

Streszczenie ma mieć następującą strukturę:

j. polski		j. angielski
Podstawy zagadnienia:	jedno zdanie	Background:
Podtytuły:	do każdego podtytułu 3-5 zdań	Subtitles:
Wnioski:	2 zdania	Conclusions:
Słowa kluczowe:	do 8 słów	Key words:

Takie streszczenia standardowe mogą być ważne, gdyż obecnie czyta się je komputerowo. Treść streszczenia zachęca bądź nie zachęca do przeczytania całego artykułu.

Prosimy również Autorów o podawanie adresów e-mail, o ile je mają.

Cennik odbitek prac dla Autorów w 2003 r.

Liczba odbitek	50	100	200	400
Cena zł	100,00	120,00	150,00	200,00

Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy

## Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

### *Prenumerata na rok 2003*

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2003 pod adresem:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: [jkawiak@cmkp.edu.pl](mailto:jkawiak@cmkp.edu.pl)

na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,

IV O/Warszawa 12401053-40006576-2700-401112-001.

Cena prenumeraty rocznika na rok 2003:

dla instytucji (bibliotek) wynosi 150 zł,

dla odbiorców indywidualnych 50 zł.

### *Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2003*

should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,

tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: [jkawiak@cmkp.edu.pl](mailto:jkawiak@cmkp.edu.pl):

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,

IV O/Warszawa, No 12401053-40006576-2700-401112-001.

Price per year 25 dollars USA

### Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK

Pracownicy w dziale wydawnictw powinni być świadomi, że w ramach projektu Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK (BRK) nie ma celu wyodrębnić z listy tytułów, które są objęte projektem, tylko te, które są objęte projektem. Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK (BRK) nie ma celu wyodrębnić z listy tytułów, które są objęte projektem, tylko te, które są objęte projektem. Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK (BRK) nie ma celu wyodrębnić z listy tytułów, które są objęte projektem, tylko te, które są objęte projektem.

Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK

1. Tytuł	2. Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK
1. Tytuł	2. Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK
1. Tytuł	2. Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK
1. Tytuł	2. Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK
1. Tytuł	2. Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK

Pracownicy w dziale wydawnictw powinni być świadomi, że w ramach projektu Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK (BRK) nie ma celu wyodrębnić z listy tytułów, które są objęte projektem, tylko te, które są objęte projektem. Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK (BRK) nie ma celu wyodrębnić z listy tytułów, które są objęte projektem, tylko te, które są objęte projektem.

1. Tytuł	2. Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK
----------	---------------------------------------------------------------------------

Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK

### Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK

Pracownicy w dziale wydawnictw powinni być świadomi, że w ramach projektu Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK (BRK) nie ma celu wyodrębnić z listy tytułów, które są objęte projektem, tylko te, które są objęte projektem. Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK (BRK) nie ma celu wyodrębnić z listy tytułów, które są objęte projektem, tylko te, które są objęte projektem.

Pracownicy w dziale wydawnictw powinni być świadomi, że w ramach projektu Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK (BRK) nie ma celu wyodrębnić z listy tytułów, które są objęte projektem, tylko te, które są objęte projektem. Wskazywanie przycelowania egzempli i przekazywanie do publikacji w BRK (BRK) nie ma celu wyodrębnić z listy tytułów, które są objęte projektem, tylko te, które są objęte projektem.





## INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron druku i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi);

2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach druku z kilkoma pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);

3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie z podwójnym odstępem. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s. 687) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stronę powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszcza tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ółwkami na margiesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.] *Histone and Nucleohistones*. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64..

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rycin powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. **Barwne ryciny i zdjęcia są płatne.** Wymiary poszczególnych rycin, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko 1. autora i oznaczenie góry i dołu ilustracji. Jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiedzą na list redaktora. Od stycznia 2003 r. Redakcja wprowadza **odpłatność 300,- zł za artykuł** nie przekraczający 15 str. druku.

Redakcja prosi także o dołączenie tytułu artykułu i podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin	Treść pracy nie była uprzednio publikowana,	
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	<i>tak nie</i> nie została wysłana do innej redakcji	<i>tak nie</i>
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście	<i>tak nie</i> Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM	<i>tak nie</i>

Odpowiadam za całość pracy opisaną w załączonym maszynopisie *tak nie*

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w „Postęпах Biologii Komórki” przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji.

*podpisy wszystkich autorów*

TREŚĆ – CONTENTS

W tym zeszycie PBK	531
KOŁACZKOWSKA E.: Cyklooksyzgenazy I. Rola w odczynie zapalnym Cyclooxygenases I. Role in inflammation	533
KOŁACZKOWSKA E.: Cyklooksyzgenazy II. Niesteroirowe Leki Przeciwwzapalne jako ich inhibitory Cyclooxygenases II. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as their inhibitors	555
DZIGA D.: Wpływ wanadu na gospodarke cukrową organizmu i przebieg innych procesów komórkowych Influence of vanadium on sugar metabolism and other processes in the cell	579
STĘPIEŃ K.: Transdukcja sygnałów w komórce roślinnej pod wpływem stresów abiotycznych Abiotic stress signaling pathways in plant cell	595
MATKOWSKI A.: Tlenek azotu u roślin Nitric oxide in plants	613
SOWIŃSKI P.: Plazmodesmy, jako element systemu komunikacji w roślinach Plasmodesmata as the part of the communication system in plants	627
CHADZIŃSKA M.: Wpływ morfiny na układ odpornościowy kręgowców The effect of morphine on immunity of vertebrates	637
BOGUSŁAWSKA D. M., SIKORSKI A. F.: Dziedziczne anemie hemolityczne u myszy: od pełnej charakterystyki do terapii genowej The hereditary haemolytic anaemias in mice: from complete characteristics to gene therapy	657
JACKOWSKI G.: Regulacja ekspresji genów jądrowych przez sygnały plastydowe Regulation of expression of nuclear genes by plastid signals	663
ŚLĘZAK M.: Prezentacja antygenu w mózgu Antigen presentation in the brain	673
Wskazówki przygotowania rycin i streszczeń do publikacji w PBK oraz Warunki prenumeraty kwartalnika PBK	687