

Biotechnologia

wybrane zagadnienia

Biotechnology

selected issues

1



Redakcja
Kamil Maciąg
Kinga Kropiweic
Mirosław Szala

Politechnika Lubelska
Lublin 2014

Biotechnologia

wybrane zagadnienia

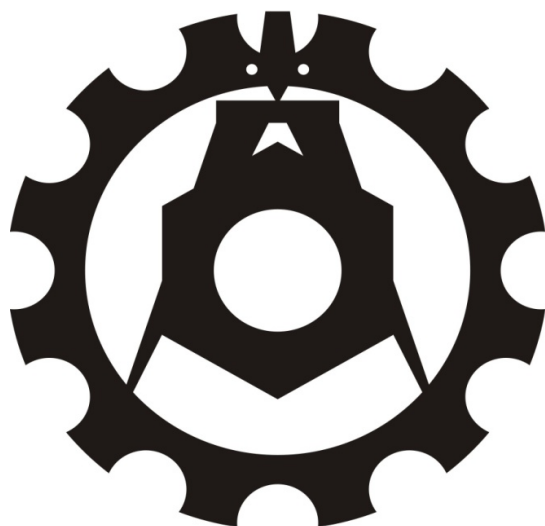
Biotechnology

selected issues

1

Politechnika Lubelska

Wydział Mechaniczny



Biotechnologia

wybrane zagadnienia

Biotechnology

selected issues

1

redakcja

Kamil Maciąg

Kinga Kropiweic

Mirosław Szala



Politechnika Lubelska
Lublin 2014

Recenzenci:

prof. dr hab. n. med. Stanisław Czuczwar

prof. dr hab. n. med. Janusz Kocki

prof. dr hab. Jerzy Rogalski

dr hab. n. med. Joanna Chorostowska-Wynimko, prof. nadzw. IGiCHP

dr hab. n. med. Monika Podhorecka

dr hab. n. med. Piotr Kopiński

dr hab. n. med. Jacek Kurzepa

dr hab. inż. Rudolf Słota

Wszystkie opublikowane artykuły zostały pozytywnie zrecenzowane

Wydano za zgodą Rektora Politechniki Lubelskiej

© Copyright by Politechnika Lubelska 2014

ISBN 978-83-7947-045-7

Wydawca: Politechnika Lubelska

ul. Nadbystrzycka 38D, 20-618 Lublin

Realizacja: Biblioteka Politechniki Lubelskiej

Ośrodek ds. Wydawnictw i Biblioteki Cyfrowej

ul. Nadbystrzycka 36A, 20-618 Lublin

tel. (81) 538-46-59, email: wydawca@pollub.pl

www.biblioteka.pollub.pl

Druk: TOP Agencja Reklamowa Agnieszka Łuczak

www.agencjatorp.pl

Elektroniczna wersja książki dostępna w Bibliotece Cyfrowej PL www.bc.pollub.pl

Nakład: 50 egz.

SPIS TREŚCI

METODA IZOLACJI I ROZDZIAŁU CAŁOŚCIOWEJ FRAKCJI BIAŁEK Z ZIAREN PYŁKU <i>TINANTIA ANOMALA</i> (TORR.) C.B. CLARKE, <i>PAEONIA OFFICINALIS</i> L. ORAZ <i>LILIUM LANCIFOLIUM</i> L.....	7
<i>JOANNA GĘBURA, JOANNA DYBEK, KRYSZYNA WINIARCZYK</i>	
NAPOJE ENERGETYCZNE – CZY NAPRAWDĘ DODAJĄ SKRZYDEŁ?	19
<i>MARCIN URBAŃCZUK, MAGDALENA AMAROWICZ, KATARZYNA SCHAB, PAULINA MULAŁKA, DOMINIKA MULAŁKA, PAULINA SOBSTYL, JAN SOBSTYL, PAULINA CHWIL, KAROL TERLECKI, LIDIA KOTUŁA</i>	
NIEWIRUSOWY TRANSFER GENÓW – PRZEGLĄD METOD	27
<i>ARKADIUSZ GOEDE, JOANNA GOLIŃSKA, TOMASZ WANDTKE, JOANNA WIELIKDZIEŃ</i>	
SAMOBÓJCZA TERAPIA GENOWA W PRÓBACH LECZENIA NOWOTWORÓW – PRZEGLĄD STRATEGII	43
<i>MACIEJ GAWROŃSKI, TOMASZ WANDTKE, JOANNA WIELIKDZIEŃ, PIOTR KOPIŃSKI</i>	
SUBSTYTUTY SKÓRY ORAZ INŻYNIERIA TKANKOWA W REGENERACJI UBYTKÓW SKÓRY	57
<i>SYLWIA KATARZYNA KRÓL, DOROTA CHOROSZYŃSKA, ARKADIUSZ MACHETA, MAGDALENA OSIĄK, NATALIA PAJĄK</i>	
SUBSTANCJE ROŚLINNE POWODUJĄCE WZROST WYDATKU ENERGETYCZNEGO STOSOWANE W SUPLEMENTACH DIETY WSPOMAGAJĄCYCH REDUKCJĘ MASY CIAŁA.....	67
<i>JOLANTA KARWAT, ALICJA NIEDOJADŁO, PAULINA GIL-KULIK, LIDIA KOTUŁA, ANNA GRAD, KAROLINA GIL, KATARZYNA KAŁAKUCKA, ELŻBIETA MAJEWSKA, MARTYNA MARKOWSKA, KATARZYNA KULISZ, DOMINIKA ŻMUREK, EWA KOŁODZIEJ</i>	
TRÓJWYMIAROWE HODOWLE KOMÓRKOWE – BRAKUJĄCE OGNIWO MIĘDZY MODELAMI <i>IN VITRO</i> I <i>IN VIVO</i>?	77
<i>SYLWIA KATARZYNA KRÓL, DOROTA CHOROSZYŃSKA, ANNA WAWRUSZAK, KAROLINA OKŁA</i>	
WPLYW DENDRYMERU PAMAM 3 GENERACJI NA KOMÓRKI WYBRANYCH SZCZEPÓW DROŻDŻY <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	95
<i>KATARZYNA BARCHIEWICZ, KAROLINA JOŃCZYK</i>	
ZAWARTOŚĆ KWASU KYNURENINOWEGO W PREPARATACH ZIOŁOWYCH POPRAWIAJĄCYCH PAMIĘĆ	107
<i>MONIKA TURSKA, ADAM IWANIUK, JAKUB PELAK, MICHAŁ P. TURSKI</i>	

METODA IZOLACJI I ROZDZIAŁU CAŁOŚCIOWEJ FRAKCJI BIAŁEK Z ZIAREN PYŁKU *TINANTIA ANOMALA* (TORR.) C.B. CLARKE, *PAEONIA OFFICINALIS* L. ORAZ *LILIUM LANCIFOLIUM* L.

1. Wprowadzenie

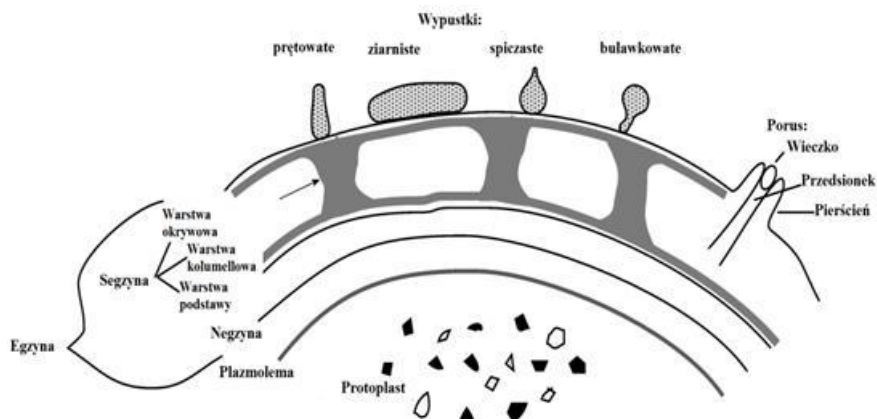
Rośliny okrytonasienne (*Angiospermae*) obejmują ponad 260 000 gatunków należących do 453 rodzin. Ich cechą charakterystyczną jest wytwarzanie kwiatów, w których znajdują się organy generatywne (słupek oraz pręciki). Ponadto u roślin okrytonasiennych zachodzi podwójne zapłodnienie, w wyniku którego powstaje zygota oraz zwykle triploidalne bielmo. Zarodek wraz z całym zalążkiem przekształca się w nasienie, które jest zamknięte w owocni powstałej z zalążni słupka [1]. *Angiospermae* przechodzą cykl rozwojowy złożony z dwóch pokoleń organizmów. Dominującym jest tutaj diploidalny sporofit, który wyrasta na samodzielną roślinę. Natomiast haploidalne gametofity powstają ze specjalnych komórek sporofitu i są całkowicie od niego uzależnione. U większości roślin kwiatowych gametofitem żeńskim jest 7-komórkowy woreczek zalążkowy, a męskim 3-komórkowe ziarno pyłku. Rozmnażanie generatywne zapewnia zmienność gatunkowa i umożliwia przystosowanie roślin do zmieniających się warunków środowiska roślin. Niezbędnym etapem tego procesu jest zapylenie, które rozpoczyna fazę progamiczną. Obejmuje ona okres od osadzenia pyłku na znamieniu poprzez wzrost łagiewki pyłkowej w szyjce słupka i zalążni aż do momentu dotarcia łagiewki do woreczka zalążkowego. To właśnie w trakcie tej fazy gametofity dojrzewają a w etapie końcowym łączą się, dając początek nowej roślinie. Procesy sterujące właściwym przebiegiem fazy progamicznej nie są do końca poznane [2]. Wiadomo, że istnieje szereg przystosowań związanych z przyjęciem lub odrzuceniem niezgodnego pyłku. Istnieją przypuszczenia, że sygnały chemiczne wysyłane przez męski i żeński gametofit oraz tkanki transmisyjne słupka są główną przyczyną wzajemnego rozpoznawania się ziaren pyłku oraz woreczków zalążkowych [3, 4].

W budowie anatomicznej gametofitów męskich można wyróżnić protoplast z organellami (komórka generatywna i wegetatywna) otoczony ścianą sporodermalną. Sporoderma składa się zazwyczaj z dwu warstw powstających

¹ joanna.gebura@tlen.pl, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii

² Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Anatomii i Cytologii Roślin

stopniowo w miarę rozwoju ziarna pyłku. Pod koniec mejozy pojawia się egzyna (warstwa zewnętrzna) niejednokrotnie o skomplikowanej, kilkuwarstwowej budowie (negzyna, segzyna i jej elementy), która z czasem zostaje wysycona sporopoleniną. Dzięki temu ściany ziaren pyłku są twarde, trwałe oraz odporne na czynniki zewnętrzne. Sporopolenina jest najbardziej stabilną i odporną na rozkład substancją, jaka występuje w świecie roślin. Jej skład chemiczny jest słabo poznany. Analizy wykazały, że tworzą ją głównie biopolimery długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, fenylopropanoidów, fenoli oraz śladowych ilości karotenoidów. Morfologiczna struktura egzyny (charakterystyczny układ porów i bruzd) wykazuje specyficzność gatunkową dzięki determinacji jej budowy przez genom sporofitu. Egzyna składa się głównie z polisacharydów i mukopolisacharydów z dodatkiem tłuszczów i białek. Warstwa wewnętrzna sporodermi zakłada się pod koniec procesu mikrosporogenezy i jest nią zazwyczaj cienka, celulozowo-pektynowa intyna [5]. Dokładną budowę ściany ziarna pyłku przedstawia rysunek 1.



Rys. 1. Struktura ściany ziarna pyłku z elementami charakterystycznymi dla rzeźby egzyny: wypustkami (*projections*) oraz porami otoczonymi pierścieniem (*annulus*) i przykrytymi wieżkiem (*operculum*). Do ich wnętrza prowadzi przedśionek (*vestibule*) [5].

W zagłębieniach urzeźbionej egzyny, jak i na jej powierzchni odkładają się związki niskocząsteczkowe (np. karoteny, flawonoidy), związki lipidowe, węglowodany i białka (wykazujące również aktywność enzymatyczną) [6, 7, 8]. Substancje te mogą formować różnorodne wypustki na przykład w postaci buławek (*clavate*), ziaren (*verrucate*), prętów (*baculate*) lub ostro zakończonych struktur (*echinate*). Związki występujące na powierzchni egzyny pochodzą głównie z tkanki odżywiającej dojrzewające mikrospory, czyli tapetum i tworzą płaszcz pyłkowy (*pollen coat*). Jeśli wśród nich przeważają związki lipidowe to nazywa się go „pollenkitem”, a w przypadku gdy większość stanowią białka

i węglowodany „tryphine”. Specyficzny skład płaszcza pyłkowego odpowiada za rozpoznawanie ziaren pyłku przez znamię słupek, a jego składniki białkowe wywołują samoniezgodność sporofitową [9, 10, 11, 12]. Białka występują także we wnętrzu ziaren pyłku (białka cytoplazmatyczne oraz białka w wewnętrznych warstwach intyny) i w odróżnieniu od białek płaszcza są one wynikiem ekspresji genów mikrogametofitu, a także mogą odpowiadać za samoniezgodność gametofitową [13, 14, 15, 16].

Substancje białkowe stanowią duży udział w strukturze ziaren pyłku. W protoplasście i płaszczu pyłkowym zidentyfikowano około 85 białek enzymatycznych, które pełnią różnorodne funkcje na tak ważnych etapach rozmnażania generatywnego roślin jak dojrzewanie ziaren pyłku, kiełkowanie w łagiewkę pyłkową oraz jej dalszy wzrost [17]. Do tej pory zidentyfikowano liczne enzymy, na przykład kwaśne fosfatazy, rybonukleazy, esterazy, amylazy, proteazy, peroksydazy, katalazy i inne. Ahokas (1976) określił dokładną rolę enzymów wykrytych u kukurydzy. Zidentyfikował esterazy w ścianach i płaszczu ziaren pyłkowych *Zea mays* oraz wykazał, że hydrolizują one egzynę umożliwiając kiełkowanie łagiewki pyłkowej [18]. Roggen i Stanley (1969) udowodnili, że β -glikonaza i pektynaza wpływają stymulująco na wzrost łagiewki pyłkowej u *Brassica campestris* i *B. napus* [19]. Natomiast poligalakturonaza obecna w dojrzałych ziarnach pyłku i na szczycie łagiewki pyłkowej u *Brassica napus* powoduje degradację pektyn i dzięki temu ułatwia łagiewce penetrację pomiędzy komórkami słupek [20].

Metody izolacji i identyfikacji białek otrzymanych z płaszcza pyłkowego lub całego ziarna pyłku są zwykle dostosowywane do gatunku, z którego pozyskuje się materiał badawczy. Jest to bardzo ważny aspekt ze względu na ogromną różnorodność w składzie chemicznym ziaren pyłku różnych gatunków roślin. Dlatego należy przeprowadzić proces optymalizacji wybranej metody indywidualnie dla poszczególnych gatunków. Do najchętniej używanych technik pozyskania całościowej frakcji białek zalicza się ekstrakcję fenolową.

Techniki elektroforetyczne są najczęściej stosowanymi metodami separacji cząstek organicznych. Wykorzystuje się w nich zjawisko elektrokinetyczne, w którym makrocząsteczki obdarzone pewnym ładunkiem elektrycznym przemieszczają się pod wpływem działającego pola elektrycznego. Ruch cząsteczek zależy od ich wielkości, ładunku, kształtu oraz oporów ruchu środowiska. Techniki elektroforetyczne umożliwiają bardzo wysoki stopień rozdzielczości cząstek organicznych przy niewielkich nakładach finansowych, a w połączeniu z technikami immunobarwienia posiadają również zalety wysokiej selektywności [21]. Rozdział białek pochodzących z generatywnych części roślin staje się możliwy dzięki wykorzystaniu elektroforezy dwukierunkowej (2D, IEF-SDS/PAGE), w trakcie której białka zostają rozdzielone na pierwszym etapie według ich punktu izoelektrycznego, a w etapie drugim na podstawie mas cząsteczkowych. Przeprowadzenie takich analiz z pojedynczych ziaren pyłku jest bardzo interesujące z teoretycznego, jak

i praktycznego punktu widzenia. Gametofity męskie stanowią bowiem wygodny materiał do badań porównawczych ze względu na ich haploidalność i wyrównane stadium fizjologiczne. Pojedyncze ziarno pyłku posiada zbyt mało substancji peptydowych, aby było to możliwe przy użyciu standardowego sprzętu. Pożądana jest w tym przypadku jego miniaturyzacja lub zgromadzenie wystarczającej ilości materiału w podobnym stadium rozwojowym [22].

2. Materiał i metody

2.1. Materiał biologiczny

Materiał do badań stanowiły następujące rośliny: *Paeonia officinalis* L. (*Paeoniaceae*), *Lilium lancifolium* (*Liliaceae*) L. oraz *Tinantia anomala* (Torr.) C.B. Clarke (*Commelinaceae*). Nasiona *T. anomala* pochodziły z Ameryki Środkowej (Stan Teksas), a sama roślina była uprawiana w warunkach szklarniowych w szklarni przy Zakładzie Anatomii i Cytologii Roślin, UMCS w Lublinie. *P. officinalis* oraz *L. lancifolium* pochodziła z Ogródu Botanicznego UMCS w Lublinie, była uprawiana w warunkach naturalnych.

Do analiz pobierano główki pręcikowe z osobników rosnących w jednej populacji. Ponieważ *T. anomala* posiada dwa różne rodzaje pylników pozyskany z niej materiał podzielono na dwie próby (pylniki krótkie i pylniki długie), które zbierano w okresie od listopada do czerwca. Pylniki *P. officinalis* oraz *L. lancifolium* zbierano w okresie kwitnienia (maj – czerwiec). Dojrzały pyłek pobierano przy użyciu sterylnej pincety wprost do probówek Eppendorfa. Tak pozyskany materiał przechowywano w temperaturze -20°C .

2.2. Metody badawcze

2.2.1. Homogenizacja materiału biologicznego

Zamrożony materiał biologiczny rozcierano w probówce Eppendorfa przy użyciu teflonowego tłoczka aż do uzyskania sproszkowanych pylników. Homogenizacja przebiegała w ciekłym azocie.

2.2.2. Izolacja całościowej frakcji białek z ziaren pyłku

Całościową frakcję białek pozyskiwano na drodze ekstrakcji fenolowej według zmodyfikowanej metody Hurkman'a i Tanaki (1986) [23]. Pierwotnie sproszkowany materiał zawieszano w buforze ekstrakcyjnym pH 7 o następującym składzie: 0,7 M sacharoza, 0,5M Tris, 30mM HCl, 30 mM EDTA, 2 mM PMSF i 13 mM DDT; a następnie wytrząsano go intensywnie przez 10 min. z równą objętością rozpuszczonego w wodzie fenolu. W kolejnym etapie powtórnie wytrząsano uzyskany ekstrakt fenolowy z równą objętością buforu ekstrakcyjnego w celu usunięcia z warstwy fenolowej większości substancji niebiałkowych.

Białka z fazy fenolowej wytrącano 0,1M octanem amonu w metanolu przez 24 godziny w temperaturze -20°C . Po odwirowaniu osadu białkowego suszono go pod próżnią i rozpuszczano w odpowiedniej ilości buforu „rozpuszczającego” o następującym składzie: 7M mocznik, 2M Tiomocznik, 2% Chaps, 2% IPG (3-10) oraz 40 mM DTT.

2.2.3. Przeprowadzenie pierwszego kierunku elektroforezy – izoelektroogniskowanie (IEF)

Uzyskany roztwór białkowy rozprowadzano równomiernie pomiędzy elektrodami w rynience aparatu do izoelektroogniskowania, a następnie umieszczano w nim paski żelowe (ReadyStrip IPG Strips 3-10,7 cm lub 11 cm, Bio-Rad), aby roztwór mógł uwodnić żel. W kolejnym etapie paski pokrywano po całej powierzchni 1 ml oleju mineralnego i rozpoczynano proces izoelektroogniskowania w specjalnym aparacie (Protein IEF Cell, Bio-Rad). Używane parametry rozdziału to $8000\text{V}/20\mu\text{A}/\text{Strip}$. Proces IEF składał się z dwóch etapów. Pierwszym była 12-godzinna rehydratacja pasków żelowych, a drugim właściwy rozdział białek pod względem ich punktów izoelektrycznych (pI).

Po rozdziale w pierwszym kierunku paski żelowe były równoważone w odpowiednich warunkach. W tym celu przenoszono je do 20% roztworu DTT (sporządzonego w buforze odwracającym o składzie: 2 M mocznik, 2 M tiomocznik, 2% Chaps, 0,5% IPG) na 20 min (2x po 10 min w 2 ml roztworu/Strip), a następnie do 25% roztworu IAA również sporządzonego w buforze odwracającym (2x 10 min w 2 ml roztworu/Strip).

2.2.4. Przeprowadzenie drugiego kierunku elektroforezy – rozdział w żelu poliakrylamidowym

W drugim kierunku białka rozdzielano w 12,5% żelu poliakrylamidowym o wymiarach: 8,6 cm x 6,7 cm x 1,5 mm lub 20 cm x 18,5 cm x 1,5 mm. Po zrównoważeniu paski żelowe osuszono na bibule i przenoszono na żel poliakrylamidowy. Jako standardu do porównywania mas białkowych używano standardu do CBB firmy Bio – Rad o nazwie Prestained SDS-PAGE Standards. Całość (standard oraz Strip) pokrywano warstwą agarozy (0,8%) i rozpoczynano rozdział białek pod względem ich mas cząsteczkowych. Rozdział prowadzono przez około 2 godziny (100 V, 118 mA, 12 W) w buforze elektroforetycznym Laemmli’ego.

2.2.5. Wybarwienie rozdzielonych białek

Barwienie rozdzielonych w żelu białek przeprowadzono systemem Coomassie Brilliant Blue (używano 0,125 % roztworu barwnika sporządzonego w mieszaninie 10 % kwasu octowego i 40 % metanolu) w czasie 12-14h, a następnie wypłukiwano barwnik z tła żelu. Wypłukiwanie prowadzono przy użyciu specjalnego roztworu do dekoloryzacji (10% kwas octowy, 40% metanol, woda MiliQ) przez 12 h, a następnie płukano żel w wodzie miliQ przez kolejne 12 h.

Aby zwiększyć czułość wykrywania białek w żelu stosowano także wybarwienie srebrem. Procedura ta składała się z następujących etapów:

- uczulanie żelu w mieszaninie etanolu, kwasu octowego i wody (1:3:6)
- inkubacja żelu w mieszaninie uczulającej z dodatkiem tiosiarczanu sodu oraz octanu sodu
- płukanie żelu w wodzie miliQ
- impregnacja żelu roztworem azotanu srebra (0,2%)
- powtórne płukanie żelu w wodzie miliQ
- rozwijanie żelu w roztworze węglanu sodu z dodatkiem formaldehydu
- zatrzymywanie reakcji w roztworze glicyny (0,8%).

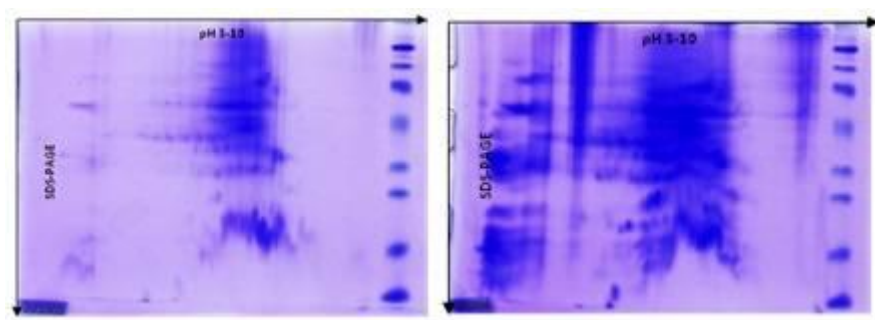
2.2.6. Skanowanie uzyskanych wyników

Uzyskane żełe z rozdzielonymi białkami skanowano przy pomocy programu EPON SCAN i skanera Image Scanner III GE Healthcare.

3. Wyniki i dyskusja

Przeprowadzone wstępne analizy proteomu ziaren pyłku wykonano dla trzech gatunków roślin pochodzących z różnych klas (*L. lancifolium* i *T. anomala* należą do klasy jednoliściennych, a *P. officinalis* do klasy dwuliściennych). Stosowane metody badawcze były optymalizowane dla konkretnego materiału biologicznego.

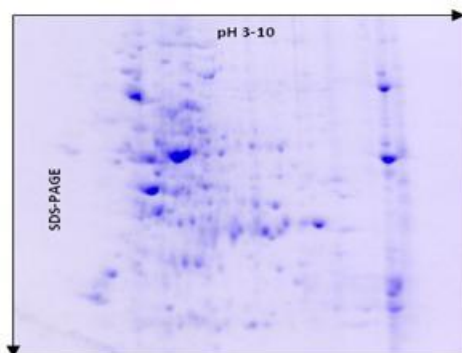
Izolację białek z całych ziaren pyłków *P. officinalis* przeprowadzono metodą Hurkman i Tanaka (1986) używając do analizy 100 mg materiału w dwóch powtórzeniach. Zastosowano. Roztwór otrzymany po ekstrakcji zawierał białka pochodzące zarówno z płaszczka pyłkowego, jak i protoplastu. Kalinowski i in. (2002) [24] sugeruje, że ekstrakcja białek powinna odbyć się najpierw poprzez odmycie płaszczka białkowego, a następnie homogenizację protoplastów i pozyskanie z nich białek. Rozdział elektroforetyczny przeprowadzono wg standardowych metod z wykorzystaniem 7 cm pasków do IEF. Próbkę rozpuszczono w buforze nie zawierającym tiomocznika dla sprawdzenia, czy takie warunki będą odpowiednie do analiz grupy białek otrzymanej z ziaren pyłku. Rozdzielone białka wybarwiono systemem CBB. Otrzymane wyniki ilustruje rysunek 2.



Rys. 2. Żele przedstawiające rozdział elektroforetyczny całkowitej frakcji białek uzyskanej z ziaren pyłku *P. officinalis* po izoelektroogniskowaniu na paskach żelowych o długości 7 cm.

Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że ilość materiału użytego do badań była zbyt duża do rozdzielenia go na 7cm paskach żelowych. Dodatkowo zaciemnienie obrazu przez pojawiające się smugi sugerowało, że izolacja frakcji białkowej nie została przeprowadzona zbyt precyzyjnie. Osad białkowy był zanieczyszczony lipoproteinami. Miejscowe zaciemnienia sugerowały o niecałkowitym rozpuszczeniu próbki białkowej.

W drugim etapie badań piwonii zmniejszono ilość materiału badawczego do 60 mg pylników. Ponadto do izoelektroogniskowania użyto dłuższych pasków żelowych o długości 11 cm. Wprowadzono również zmiany w trakcie izolacji materiału białkowego (użyto buforu ekstrakcyjnego o pH 7), jak również w składzie buforu „rozpuszczającego” (dodatek tiomocznika). Do wybarwienia białek zastosowano system CBB. Otrzymane wyniki przedstawia rysunek 3.

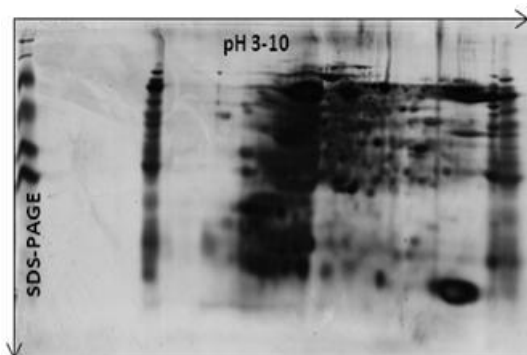


Rys. 3. Żel przedstawiający rozdział elektroforetyczny całkowitej frakcji białek uzyskanej z ziaren pyłku *P. officinalis* po izoelektroogniskowaniu na paskach żelowych o długości 11cm.

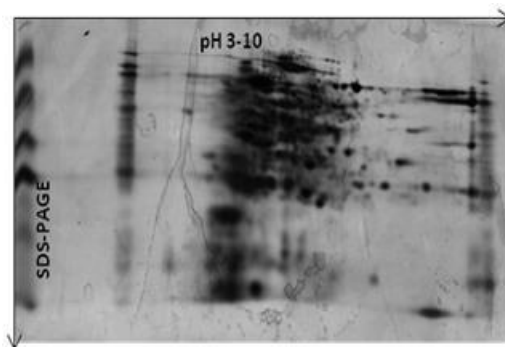
Wykonany rozdział był zdecydowanie bardziej czytelny od rozdziału przeprowadzonego w pierwszej próbie. W żelu można zidentyfikować pojedyncze peptydy. Wyeliminowano także defekty w postaci smug i zaciemnień.

Następnie wykonano izolację całościowej frakcji białek z pylników *L. lancifolium*. Do analizy wzięto 100 mg pylników, a otrzymany osad białkowy wykazywał charakterystyczne ciemnobrunatne zabarwienie, który po płukaniu acetonem uległ odbarwieniu. Przy próbie rozpuszczenia osadu, okazało się, że jest to niemożliwe w objętości wymaganej do aplikacji prób na 11 cm paski żelowe (200 μ l). Przyczyną takiej sytuacji mogły być znaczne rozmiary protoplastów w ziarnach pyłkowych lili oraz duże ilości występujących w nich substancji białkowych. Dalsze badania dla tego gatunku nie były prowadzone.

W ostatnim etapie badań zajęto się przeprowadzeniem analizy profilu białkowego ziaren pyłkowych pochodzących z *T. anomala*. U tego gatunku występuje dimorfizm pręcików, dlatego wykonano analizę dwu prób: 1 – pochodząca z pylników długich, a 2 – z pylników krótkich. Izolację frakcji białkowej przeprowadzono według procedury stosowanej w drugiej próbie badań wykonanych na piwonii. Pobrano odpowiednio 100 mg ziaren z pylników długich oraz 50 mg ziaren z pylników krótkich. Dodatkowo przy rozdziale w żelu poliakrylamidowym zastosowano żel wprowadzający o stężeniu 16,5%. Izoelektroogniskowanie przeprowadzono na paskach żelowych o długości 11cm, a do uwidocznienia białek zastosowano metodę barwienia srebrem. Uzyskane wyniki rozdziału białek z pylników długich obrazuje rysunek 4, a z pylników krótkich rysunek 5.



Rys. 4. Żel przedstawiający rozdział elektroforetyczny całkowitej frakcji białek uzyskanej z ziaren pyłku pylników długich *T. anomala* po izoelektroogniskowaniu na paskach żelowych o długości 11 cm



Rys. 5. Żel przedstawiający rozdział elektroforetyczny całkowitej frakcji białek uzyskanej z ziaren pyłku pylników krótkich *T.anomala* po izoelektroogniskowaniu na paskach żelowych o długości 11cm.

Procedurę izolacji frakcji białkowej *T. anomala* należy zoptymalizować pod względem dostosowania odpowiedniej metodyki homogenizacji i ekstrakcji białek z materiału roślinnego. Pojawiające się smugi i zaciemnienia żelu mogą świadczyć o błędach popełnionych w trakcie izolacji frakcji białkowej. Prawdopodobnie nastąpiło zanieczyszczenie frakcji białkowej lipoproteinami.

4. Podsumowanie

Ziarna pyłku roślin okrytonasiennych stanowią bardzo interesujący materiał do badań proteomicznych. Ze względu na niewielkie rozmiary, jak również porównywalne stadium fizjologiczne można dokładnie określić ich skład białkowy. Jest to bardzo ważne dla badania procesów embriologicznych roślin okrytonasiennych, ponieważ daje możliwość poznania mechanizmów kontrolujących poszczególne etapy fazy progamicznej. Badania ziaren pyłku niosą ze sobą nie tylko wartości poznawcze, ale także aplikacyjne. Mogą być wykorzystane do przełamywania barier samoniezgodności i niezgodności międzygatunkowej w pracach hodowlanych.

Metoda izolacji całkowitej frakcji białek z ziaren pyłkowych wymaga indywidualnego podejścia dla każdego gatunku roślin. Procedura opisana przez Tanaka i Hurkaman (1986) może być z powodzeniem stosowana u wielu gatunków roślin. Wymaga ona jednak pewnych modyfikacji, jak na przykład dostosowania pH buforu ekstrakcyjnego do ściśle określonego materiału. W przypadku rozdziału białek za pomocą elektroforezy dwukierunkowej trzeba zwrócić szczególną uwagę na skład buforu rozpuszczającego próbki, jak również na sam proces izoelektroogniskowania.

Literatura

- [1] Soltis P.S., Soltis D.E., *The origin and diversification of angiosperms*, American Journal of Botany, 2004 vol. 91, s. 1614-1626
- [2] Rodkiewicz B., Śnieżko R., Fyk B., Niewęgłowska B., Tchórzewska D., *Embriologia Angiospermae rozwojowa i eksperymentalna*, Lublin, Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, 1996
- [3] Śnieżko R., Winiarczyk K., *Znamię i pyłek – przegląd prac dotyczących zgodnego zapylenia*, Wiadomości Botaniczne, 1993 vol. 1/2, s. 31-41
- [4] Winiarczyk K., Tchórzewska D., *Pollen grain on the compatible and incompatible stigma of *Secale cereale* L.*, Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin-Polonia, 2013 vol. LXVIII, 2, s. 45-55
- [5] <http://www-ist.massey.ac.nz>
- [6] Heslop-Harrison J., *Pollen enzymes and isoenzymes*. [W:] *Pollen development and physiology* pod red. Heslop-Harrison J., London, Butterworth, 1971, s. 156-274
- [7] Stanley R.G., Linskens H.F., *Aminosauern und Proteine*, [W:] *Pollen Biologie*, Biochemie, Gewinnung und Verwendung pod red. Stanley R.G., Linskens H.F., Greifenberg, Freund, 1985, s. 182-183
- [8] Chay C.H., Buehler E.G., Horn J.M., Whelan T.M., Bedinger P.A., *Purification of mize pollen exines and analysis of associated proteins*, Plant Physiology, 1992 vol. 100, s. 756-761
- [9] Luu D.T., Heizmann P., Dumas C., *Pollen sigma adhesion In kale is not depend on the self (In)-compatibility genotype*, Plant Physiology, 1997 vol. 115, s. 1221-1230
- [10] Taylor L.P., Hepler P. K., *Pollen germination and tube growth*, Annual Review Plant Physiology, Plant Molecular Biology, 1997 vol. 48, s. 461-491
- [11] Dickinson H.G., Elleman C.J., Doughty J., *Pollen coating-chimeric genetics and new functions*, Sexual Plant Reproduction, vol. 12, s. 302-309
- [12] Heizmann P., Luu D.T., Dumas C., *Pollen-stigma adhesion in the Brassicaceae*, Annals of Botany, 2000 vol. 85(A), s. 23-27
- [13] Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y., Knox R.B., Howlett B., *Pollen Wall proteins: „gametophytic” and „sporophytic” fractions In the pollen walls of the Malvaceae*, Annals of Botany, 1973 vol. 37, s. 403-412
- [14] Vithanage H.I.M.V., Knox R.B., *Pollen development and quantitative cytochemistry of exine and intine enzymem In sunflower, Helianthus annuus L.*, Annals of Botany, 1979 vol. 44, s. 95-106
- [15] Murphy D.J., Ross J.H.E., *Biosynthesis, targeting and processing of oleosinlike proteins, which are major pollen coat components in Brassica napus*, Plant Journal, 1998 vol. 13, s. 1-16
- [16] Doughty J., Wong H.Y., Dickinson H.G., *Cysteine-rich pollen coat proteins (PCPs) and their interactions with stigmatic S (incompatibility) and S-related proteins In Brassica putative roles in SI*, Annals of Botany, 2000 vol. 85(A), s. 161-169
- [17] Radłowski M., *Enzymy hydrolityczne pyłku i lagiewki pyłkowej ze szczególnym uwzględnieniem proteaz*, [W:] *Seria Biologia nr 60*, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
- [18] Ahokas H., *Evidence of a polen esterase capable of hydrolyzing sporopollenin*, Experientia, 1976 vol. 32, s. 175-177

- [19] Roggen H.P.J.R., Stanley R.G., Cell-wall-hydrolyzing enzymem In Wall formation as measured by pollen-tube extension, *Planta*, 1969 vol. 84, s. 295-303
- [20] Dearnaley J.D.W., Daggard G.A., *Expression of polygalacturonase enzyme in germinating pollen of Brassica napus*, *Sexual Plant Reproduction*, 2001 vol. 13, s. 265-271
- [21] *Elektroforeza. Przykłady zastosowań*, red. Walkowiak B., Kochmańska V., Łódź, Warszawa, Amersham Biosciences, 2002
- [22] Kalinowski A., Radłowski M., *Elektroforetyczne rozdziały białek generatywnych części roślin*, [W:] *Elektroforeza. Przykłady zastosowań* pod red. Walkowiak B., Kochmańska V., Łódź, Warszawa, Amersham Biosciences, 2002, s. 55-60
- [23] Hurkman W.J., Tanaka C.K., Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two – dimensional gel electrophoresis, *Plant Physiology*, 1986 vol. 81, s. 802-806
- [24] Kalinowski A., Radłowski M., Bartkowiak S., Mize pollen enzymes after two-dimensional polyakrylamide gel electrophoresis in the presence or absence sodium dodecyl sulfate, *Electrophoresis*, 2002 vol. 23, s. 138-143

Metoda izolacji i rozdziału całościowej frakcji białek z ziaren pyłku *Tiniantia anomala* (Torr.) CB Clarke, *Paeonia officinalis* L. oraz *Lilium lancifolium* L.

Streszczenie

Przedmiotem pracy była optymalizacja metody izolacji oraz warunków prowadzenia rozdziału elektroforetycznego całkowitej frakcji białek pochodzącej z ziaren pyłkowych. Materiał biologiczny stanowiły pylniki następujących gatunków roślin: *Paeonia officinalis*, *Lilium lancifolium* oraz *Tiniantia anomala*. Do izolacji białek wybrano metodę fenolową opracowaną przez Hurkmana i Tanakę. Przygotowane próbki poddawano elektroforezie dwukierunkowej (2D) w żelu poliakrylamidowym, która stanowi połączenie dwóch metod – ogniskowania izoelektrycznego (IEF) oraz standardowej elektroforezy w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Do uwidocznienia rozdzielonych białek stosowano dwie metody: barwienie metodą srebrową i barwikiem Coomassie Brilliant Blue (CBB). Przeprowadzone analizy polegały na dobraniu odpowiednich parametrów prowadzenia rozdziału, jak również optymalizacji procedury ekstrakcji fenolowej. Określenie składu białkowego ziaren pyłku jest ważne z embriologicznego punktu widzenia. Umożliwi ono bowiem poznanie mechanizmów sterujących fazą progamiczną – ważnym etapem w rozmnażaniu generatywnym roślin okrytonasiennych.

Słowa kluczowe: ziarna pyłku, ekstrakcja fenolowa, elektroforeza dwukierunkowa

The method of isolation and separation total protein fraction of pollen grains *Tinantia anomala* (Torr.) CB Clarke, *Paeonia officinalis* L. and *Lilium lancifolium* L.

Abstract

The object of this study was to optimize the method for the isolation and optimize conditions of electrophoretic separation of the total protein fraction derived from pollen grains. The biological material were the anthers of the following species of plants: *Paeonia officinalis*, *Lilium lancifolium* and *Tinantia anomala* . For protein isolation chose the phenol extraction developed by Hurkmana and Tanaka. Prepared samples were separated by two-dimensional electrophoresis (2D) in a polyacrylamide gel which is a combination of two methods - the isoelectric focusing (IEF) and standard electrophoresis under denaturing conditions (SDS - PAGE). To visualize the separated proteins were used two methods: silver staining and Coomassie Brilliant Blue staining (CBB). Performed analysis consisted of the selection of appropriate parameters of conducting the separation, as well as the optimization of the phenol extraction procedure. Determination of the protein composition of the pollen grains is important for embryological view. It will allow study of the mechanisms controlling progamic phase - an important step in the generative reproduction of angiosperms.

Keywords: pollen grains, phenol extraction, two-dimensional electrophoresis

Marcin Urbańczuk¹, Magdalena Amarowicz, Katarzyna Schab, Paulina Mulawka, Dominika Mulawka, Paulina Sobstyl, Jan Sobstyl, Paulina Chwil, Karol Terlecki, Lidia Kotuła

NAPOJE ENERGETYCZNE – CZY NAPRAWDĘ DODAJĄ SKRZYDEŁ?

1. Wstęp

Napoje energetyzujące to gazowane środki bezalkoholowe, których zadaniem jest zwiększenie efektywności organizmu, dostarczenie dodatkowej porcji energii w przypadku wzrostu zapotrzebowania oraz szybka regeneracja psychofizyczna. Popularność energy drinków w ostatnim czasie dynamicznie wzrasta, szczególnie w grupie młodych osób, zwłaszcza studentów ale nie tylko. Jest to używka stosowana zarówno wśród dzieci szkolnych jak i w grupie mężczyzn w średnim wieku, co ma związek z aktywnym i stresującym stylem życia [1, 2]. EFSA (European Food Safety Authority) opublikowała raport, w którym pierwszy raz zestawiono dane na temat spożycia napojów energetyzujących w Europie przez poszczególne grupy populacji. Według tego zestawienia w grupie dorosłych (18-65 lat) około 30% przebadanych spożywało napoje energetyzujące. Spośród nich ok. 12% było stałymi konsumentami (regularnie spożywającymi napoje 4-5 razy w tygodniu lub więcej). Około 11% było konsumentami sporadycznymi (spożywającymi przynajmniej 1 litr jednorazowo). Napoje energetyzujące spożywało 68% młodych osób (10-18 lat). Spośród nich ok.12% było stałymi konsumentami, ok. 11% było konsumentami sporadycznymi. W grupie dzieci (3-10 lat) ok. 18% spożywało napoje energetyzujące, spośród nich ok.16% było stałymi konsumentami [3]. Głównymi składnikami aktywnymi napojów energetyzujących są: kofeina, tauryna, witaminy z grupy B oraz inozytol i glukuronolakton. Zawierają także dużą ilość cukrów prostych. Niektóre, mniej znane napoje, mogą zawierać również: teotrombinę, ekstrakt z guarany, kwas askorbinowy, cholinę, synefrynę, wyciąg z żeń-szenia, beta-karoten, chrom, magnez, glicynę, L-argininę, L-karnitynę, wyciąg z ostrokrzewu paragwajskiego (yerba mate), wyciąg z cytryńca chińskiego, ekstrakt z ginkgo biloba, kwas gamma-aminomasłowy, a nawet białko [4].

¹ marcin_urbanczuk@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Zakład Genetyki Klinicznej

2. Historia

Pierwszym napojem energetyzującym, który pojawił się na rynku był „Iron Brew” (z ang. żelazny napar), wyprodukowany w Szkocji w 1901r. Kilkadziesiąt lat później, a dokładnie w 1987r. w Austrii powstał „Red Bull”, który do Polski dotarł w 1995r. Dziś można go kupić w ponad 100 krajach na świecie. Jednak są kraje, które z powodu dużej zawartości kofeiny i tauryny nie zezwoliły na sprzedaż tego produktu, w innych z kolei jest dostępny tylko w aptekach [5]. Zgodnie z dyrektywą 2002/67/E Unii Europejskiej zawartość kofeiny w produktach spożywczych powinna być jasno określona. Jeśli w danym produkcie jej stężenie przekracza 150 mg/l, producent jest obowiązany umieścić na etykiecie informację „wysoka zawartość kofeiny” oraz podać stężenie w mg/100 ml. Nie ma natomiast obowiązku przestrzegania tej zasady w przypadku kawy i herbaty, a także w sytuacji gdy nazwa napoju, wskazuje, że został on wyprodukowany na bazie tych naparów [6].

3. Skład napojów energetyzujących

Większość popularnych i powszechnie dostępnych energy drinków w swoim składzie zawiera stosunkowo dużą ilość cukrów. W wyniku hydrolizy sacharozy powstają dwa cukry proste glukoza i fruktoza, które są bardzo szybko wykorzystywane w organizmie, stanowiąc dla niego coś w rodzaju „bomby energetycznej”. Niestety jest to krótkotrwała zwyżka energii, powodująca w niedługim czasie głęboki deficyt. Standardowo napoje energetyzujące zawierają od 10 do 13 gramów cukru na 100ml ale zdarzają się i takie, które w swoim składzie mają aż 27 gramów na 100ml [5]. Konsekwencją spożycia tak dużej ilości cukrów prostych może być niedobór mikroelementów, a także rozwój cukrzycy.

Efekt pobudzenia i zwiększenia wydolności psychofizycznej napoje energetyzujące zawdzięczają w głównej mierze zawartej w nich kofeinie. Działa ona pobudzająco na układ nerwowy i stymuluje wydzielanie neuroprzekaźników (serotoniny, dopaminy) i hormonów (adrenaliny). Ponadto poprawia koncentrację, refleks i logiczne myślenie, polepsza nastrój, znosi zmęczenie, zmniejsza senność, a także zwiększa zdolność uczenia się. Wywiera również wpływ na układ krążenia. Działając na serce powoduje zwiększenie siły skurczu, przyspieszenie czynności serca, zwiększenie napięcia mięśnia sercowego. Poprawia przewodnictwo w układzie bódzoprzewodzącym i nieznacznie zwiększa ciśnienie krwi. Spożywanie kofeiny wiąże się ze zwiększonym ryzykiem choroby wieńcowej, w związku z niekorzystnym wpływem kofeiny na śródbłonek naczyń, działaniem zwiększającym stężenie cholesterolu i homocysteiny we krwi [6]. Działa ona także rozszerzająco na naczynia wieńcowe, nerkowe oraz naczynia w mięśniach szkieletowych i skórze. Odwrotnie oddziałują na naczynia mózgowe powodując ich skurcz co

znalazło zastosowanie w zmniejszaniu dolegliwości związanych z bólami napięciowymi głowy i w migrenie [7]. Kofeina wpływa również na wydzielanie kwasu solnego w żołądku, przyczyniając się do podrażnienia śluzówki tego narządu, powoduje też rozluźnienie dolnego zwieracza przełyku, jednocześnie wpływa na diurezę, powodując jej zwiększenie, co w przypadku spożycia większych ilości i wzmoczonego wysiłku może doprowadzić do odwodnienia organizmu. Kofeina jako substancja psychostymulująca stosunkowo silnie pobudza nasz organizm, doprowadzając go w późniejszym efekcie do wyczerpania, pojawia się uczucie zmęczenia, podenerwowania a nawet lęku [8]. Kofeina wpływa na gospodarkę węglowodanową. Działanie kofeiny polega na zwiększeniu stężenia glukozy w organizmie w wyniku stymulacji wydzielania hormonów nadnerczy, szczególnie adrenaliny, pobudzając jednocześnie trzustkę do wyrzutu większej ilości insuliny, dochodzi do zmniejszenia tolerancji glukozy i insulinooporności. W przyszłości mechanizmy te mogą prowadzić do rozwoju cukrzycy [8].

Poza tym kofeina może mieć także wpływ na pogorszenie jakości snu, może powodować trudności z zasypianiem, jest też substancją, której regularne spożywanie prowadzi do uzależnienia. Ważne jest uświadomienie społeczeństwu jak duża ilość kofeiny zawarta jest w potencjalnym napoju energetyzującym. Ludzie pijący energy drinki nie wiedzą, że każdorazowo dostarczają swojemu organizmowi ok.80-120 mg kofeiny, aż tyle jest zawarte w 250 ml takiego napoju. Dla porównania filiżanka kawy rozpuszczalnej zawiera ok. 50-95 mg kofeiny, szklanka czarnej kawy 80-120 mg, a szklanka coca-coli ok.35-45 mg [8]. Należy tutaj dodać, że dawka śmiertelna kofeiny dla człowieka wynosi ok. 10-12 gramów [8]. Warto pamiętać, że napoje energetyzujące nie zawierają samej kofeiny ale także guaranę, która jest bogatym źródłem kofeiny, co zwiększa jej jednorazowe spożycie [9].

Guarana jest to ekstrakt z rośliny Paullinia cupana, który zawiera bardzo dużą ilość kofeiny (1 gram guarany to ok. 40mg kofeiny) [8]. Guarana działa stymulująco, znosi zmęczenie fizyczne i psychiczne, zwiększa umiejętność koncentracji i zapamiętywania. Zmniejsza ryzyko wystąpienia zawałów i udarów. Guarana wykazuje poza tym działanie antyoksydacyjne oraz przeciwbakteryjne. Działanie guarany jest bardzo zbliżone do działania kawy, różni się jednak tym, że guarana wolniej się wchłania z przewodu pokarmowego, przez co jej działanie utrzymuje się nieco dłużej i nie tak intensywnie jak kawa.

Tauryna należy do substancji endogennych, wytwarzanych przez organizm ludzki w niewielkich ilościach. Pełni istotną funkcję m.in. w sprzęganiu kwasów żółciowych przed wydaleniem ich z wątroby, co zwiększa ich rozpuszczalność i poprawia właściwości emulgujące tłuszcze. Działa antyoksydacyjnie, bierze udział w regulacji osmotycznej i stabilizacji błon komórkowych [8]. Jest ważna dla rozwoju i prawidłowego funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego, mięśni i siatkówki [8]. Pomaga transportować kreatynę do mięśni co przyspiesza

ich odbudowę po wyczerpującym wysiłku. Tauryna w OUN (ośrodkowy układ nerwowy) pełni rolę neuroprzekaźnika, gdyż należy do substancji pobudzających układ GABA-ergiczny, który ma za zadanie hamować pobudzenia w OUN. Dzięki temu ma ona korzystne działanie na funkcje poznawcze, zwiększa zdolność uczenia się. Wpływa pozytywnie na metabolizm komórek glicyrowych i neuronów [10]. Ciekawy jest również wpływ tauryny na odczuwanie przez organizm zmęczenia związanego z wysiłkiem. Otóż substancja ta zmniejsza wytwarzanie serotoniny, która jest produkowana przy nadmiernej pracy, co powoduje, że nasz organizm nie odczuwa zmęczenia i jest gotowy do dalszego działania.

Glukuronolaktonowi zawdzięcza się w głównej mierze działanie detoksykujące, polegające na usuwaniu z organizmu toksyn i szkodliwych produktów przemianu materii. Przypisuje się mu działanie zmniejszające ryzyko występowania kamieni żółciowych. Może mieć wpływ na przemiany glukozy w organizmie oraz zmniejszać uczucie senności oraz pozytywnie wpływać na refleks i koncentrację, co przydaje się w czasie wzmożonego wysiłku. Niestety na opakowaniach większości napojów energetyzujących nie ma informacji na temat zawartości glukuronolaktonu, stąd ważne jest, żeby wiedzieć, że w 100 ml napoju energetyzującego może się znajdować od 24 do 240 mg tej substancji.

Kolejnym istotnym składnikiem energii drinków jest inozytol. Bierze udział w metabolizmie tłuszczów i cholesterolu, posiada zdolność usuwania złogów cholesterolu, działa uspokajająco, poprawia sprawność umysłową. Wpływa na gospodarkę wapniowo-fosforanową, podwyższając poziom fosforu w organizmie, dlatego zażywając produkty z jego zawartością powinniśmy pamiętać o suplementacji wapnia, by utrzymać równowagę między tymi dwoma pierwiastkami. Oddziałuje on na równowagę pomiędzy miedzią i cynkiem w mózgu wpływając tym samym na samopoczucie. Inozytol i jego pochodne są stosowane do leczenia chorób związanych z zaburzeniami odżywiania oraz niektórych chorób psychiatrycznych. Dzielne zapotrzebowanie na inozytol wynosi 500-1000 mg/dobę. Niestety, na opakowaniach napojów energetyzujących podobnie jak w przypadku tauryny konsumenci często nie znajdują informacji o jego zawartości.

Napoje energetyzujące mają w swoim składzie szereg witamin z grupy B. Ich zadaniem jest przyspieszanie procesów regeneracji organizmu, ponieważ są one niezbędnymi kofaktorami reakcji enzymatycznych związanych z produkcją energii i metabolizmem białek. Podczas wyczerpanej pracy fizycznej rośnie zapotrzebowanie organizmu na witaminy z grupy B, a także witaminy antyoksydacyjne (witaminę C i E). Witaminy z grupy B (ryboflawina, niacyna, witaminy B6 i B12): ułatwiają przemiany węglowodanów potrzebnych do pracy umysłowej i fizycznej, przeciwdziałają zaburzeniom psychicznym, działają pobudzająco, likwidują uczucie zmęczenia[11].

4. Działania niepożądane

Powszechnie reklamowane napoje energetyzujące mają pobudzić nasz organizm do działania i zwiększyć efektywność wykonywanej pracy, zarówno fizycznej i umysłowej. Niestety działanie to trwa krótko, organizm w konsekwencji staje się wyczerpany i jeszcze bardziej odczuwamy zmęczenie [12]. Duża zawartość kofeiny w napojach energetyzujących niesie za sobą szereg negatywnych konsekwencji. Przede wszystkim wywiera niekorzystny wpływ na zachowanie i psychikę, pogarsza jakość snu, powoduje trudności w zasypianiu, zwiększa ryzyko otyłości, rozwój cukrzycy, a także zakłóca funkcjonowanie w szkole [13]. Wiele osób myli napoje energetyzujące z izotonicznymi i uważa, że energy drinki służą gaszeniu pragnienia. Wręcz przeciwnie, w związku z dużą zawartością kofeiny, która wzmacnia diurezę, mogą one doprowadzić do odwodnienia organizmu, stan ten jeszcze bardziej potęguje utrata wody w wyniku pocenia się w czasie intensywnego wysiłku. Rodzice coraz częściej zgłaszają się do lekarzy ze swoimi podopiecznymi, zaniepokojeni tym, że dziecko jest zmęczone, niewyspane, skarży się na dolegliwości żołądkowo-jelitowe, nudności. To właśnie są jedne z wielu negatywnych efektów działania energy drinków na młody organizm. Istnieją też doniesienia na temat zwiększania przez napoje energetyzujące lepkości krwi, co może doprowadzić do tworzenia się skrzepów, czego skutkiem może być udar mózgu lub zawał serca. W *The Journal of American College Health* można znaleźć raport na temat zależności między napojami energetycznymi, a ryzykownymi zachowaniami. Badająca uzależnienia Kathleen Miller z University of Buffalo, doszła do wniosku, że regularne i duże spożycie napojów energetycznych wpływa na ryzykowne i agresywne zachowania, takie jak przemoc, seks bez zabezpieczeń oraz sięganie po substancje psychoaktywne [14].

Niebezpieczne jest kojarzenie energy drinków z alkoholem [8]. Badania Ferreire i wsp. (2006) pokazały, że przebadane osoby po takim połączeniu miały one uczucie, że są mniej pijane niż były w rzeczywistości, ponadto mix etanolu z napojem energetycznym sprzyjać wystąpieniu zatrucia.

Z powodu licznych działań niepożądanych należy ograniczyć spożycie energizerów. Zdecydowany zakaz powinien dotyczyć dzieci i młodzieży. Zrezygnować z nich powinny także osoby: z nadwrażliwością na kofeinę, niespokojne, zestresowane, cierpiące na syndrom chronicznego zmęczenia, z wysokim ciśnieniem, z predyspozycją do wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych oraz z zaburzeniami krzepnięcia krwi, kobiety w ciąży i karmiące piersią.

5. Zdrowsza alternatywa

Aby zwiększyć wydajność organizmu i pobudzić go do działania można zastosować naturalne sposoby, zwiększające jego aktywność. Przede wszystkim warto zadbać o właściwą ilość snu każdego dnia i regularny wypoczynek. Należy pamiętać o stałej, zrównoważonej aktywności fizycznej. Ważna jest prawidłowa dieta, wyeliminowanie zbóż i cukrów, a wzbogacenie jej w tłuszcze omega-3. Sok pomarańczowy, czekolada i świeże powietrze skutecznie pobudzają i działają stymulująco na OUN. Często przyczyną trudności z koncentracją jest niedobór magnezu, dlatego osoby narażone na duży stres i pijące w znacznych ilościach kawę powinny pamiętać o jego suplementacji. Kiedy koniecznie musimy się pobudzić to lepiej wypić filiżankę gorącej czekolady albo zastosować naturalne napoje bogate w kofeinę takie jak zielona herbata albo yerba mate.

6. Wnioski

Analizując liczne doniesienia na temat napojów energetyzujących można wysunąć wnioski, że spożywanie tych środków może przynieść wiele szkody dla organizmu ludzkiego. Niestety życie w ciągłym stresie i „na wysokich obrotach” wymaga ciągłej gotowości do działania i efektywnej pracy. Dlatego mimo wielu działań niekorzystnych energetyki będą nadal powszechnie stosowane przez społeczeństwo.

Literatura

- [1] Hoffmann, M., Świdorski, F.: *Napoje energetyzujące i ich składniki funkcjonalne*. Przem. Spoż. 2008; 29(9): 8-13.
- [2] Cichocki M.: *Napoje energetyzujące – współczesne zagrożenie zdrowotne dzieci i młodzieży*. Przegląd Lekarski 2012 / 69 / 10: 854.
- [3] *European Food Safety Authority: EFSA adopts opinion on two ingredients commonly used in some energy drinks*. 2009 [Online]
- [4] Sikora E.: *Napoje energetyzujące – korzyści i zagrożenia*. Przem. Ferm. i Owoc-warzyw., 2008; (3), 28.
- [5] Gros L., Healey K.: *Czy napoje energetyczne naprawdę dodają skrzydeł?* Project N. 129193-CP-1-2006-1-DE-COMENIUS-C21 v. 0.0 (2009-10-26)
- [6] Dworzański W., Opielak G., Burdan F.: *Niepożądane działania kofeiny*. Pol. Merk. Lek., 2009, XXVII, 161, 357
- [7] Harland B.F., *Caffeine and nutrition*. *Nutrition*, 2000, 16, 522-526.
- [8] Seifert S., Schaechter J., Hershorin E., Lipshultz S.: *Sports drinks and energy drinks for children and adolescents: are they appropriate?* *Pediatrics* 2011, 127, 1182
- [9] Gunja N., Brown J.: *Energy drinks: health risks and toxicity*. *Med. J. Aust.* 2012, 196, 46.

- [10] Kaplan B., Karabay G., Zağyapan R.D. et al.: *Effects of taurine in glucose and taurine administration*. Amino Acids 2004, 27, 327-333.
- [11] Laura Nubuck *ŚWIAT KONSUMENTA* czerwiec 2006
- [12] Cavalcanti A.L., Costa Oliveira M., Florentino V.G. et al.: *Short communication: In vitro assessment of erosive potential of energy drinks*. Eur. Arch. Paediatr. Dent. 2010, 11, 253.
- [13] Macdonald N., Stanbrook M., Hébert P.C.: „Caffeinating” children and youth. CMAJ 2010, 182, 1597.
- [14] Miller K.: *Wired: energy drinks, jock identity, masculine norms, and risk taking*. J. Am. Coll. Health 2008, 56, 481.

Napoje energetyczne – czy naprawdę dodają skrzydeł?

Streszczenie

Napoje energetyzujące stają się coraz bardziej popularne. Producenci twierdzą, że mogą poprawić wytrzymałość fizyczną, szybkość reakcji i koncentrację. Ich głównymi składnikami są kofeina, cukier, tauryna, glukuronolakton, L-carnityne i witaminy. Według producentów takie właśnie połączenie wszystkich składników jest kluczem ich działania. Dużo osób pije je w ogromnych ilościach. Nadmierne spożycie skutkuje drżeniem, nerwowością, zawrotami głowy, niezdolnością do skupienia uwagi, trudnościami z koncentracją, zaburzeniami żołądkowo-jelitowymi i bezsennością. Pracownicy ochrony zdrowia podają, że spożycie nadmiernej ilości napojów energetycznych może spowodować: odwodnienie, przyspieszenie rytmu serca, niepokój, drgawki, napady ostrej manii czy nawet udar mózgu. W poniższym artykule znajduje się aktualny przegląd informacji na temat skutków zdrowotnych napojów energetycznych.

Słowa kluczowe: napoje energetyzujące, kofeina, tauryna

Energy drinks – it really gives you wings?

Abstract

Energy drinks have become more and more popular. The manufacturers claim that these drinks improve physical endurance, reaction speed and concentration. The main ingredients of energy drinks are caffeine, sugar, taurine, glucuronolactone, l-carnityne and vitamins. According to the manufacturers, the stimulating effects of these drinks are due to interaction between the various ingredients. People are consuming these types of drinks at an alarming amount and rate. Overdose causes specific effects include jitteriness, nervousness, dizziness, the inability to focus, difficulty concentrating, gastrointestinal upset, and insomnia. Health care providers report that they have seen the following effects from the consumption of energy drinks: dehydration, accelerated heart rates, anxiety, seizures, acute mania, and strokes. This article is a comprehensive review on the health effects of energy drinks.

Keywords: energy drinks, caffeine, taurine

NIEWIRUSOWY TRANSFER GENÓW – PRZEGLĄD METOD

1. Wprowadzenie

Głównym założeniem terapii genowej jest wprowadzenie do komórek genu terapeutycznego. Transgen dostarczany jest do komórek dzięki wykorzystaniu wektorów, w których skład wchodzi zarówno wektory wirusowe, jak i wektory niewirusowe. Podstawowym założeniem dla nośników genów jest efektywny transport genów terapeutycznych do komórek, jak również ochrona transgenu przed jego zdegradowaniem lub uszkodzeniem.

Szeroko zakrojone badania nad niewirusowym transferem genów związane są z szeregiem niedogodności oraz zagrożeń, wynikających ze stosowania wektorów opartych na wirusach. Podstawowym ograniczeniem jest mała pojemność tego typu nośników oraz krótkotrwała ekspresja. Wektory typu „gutless”, cechujące się największą pojemnością wśród wektorów wirusowych [1, 2] mogą być jednak powodem trombocytopenii [3, 4]. Prawdziwym problemem wykorzystania wektorów wirusowych jest zapewnienie bezpieczeństwa ich stosowania. Większość nośników tego typu jest silnie immunogenna i powoduje ostrą odpowiedź układu odpornościowego. Odnotowano kilka przypadków zgonów po zastosowaniu wektorów opartych na wirusach w przebiegu terapii genowej. Ponadto wielokrotne podawanie transgeny z wykorzystaniem tego samego nośnika wirusowego może spowodować jego eliminację przez przeciwciała [5]. Prawie wszystkie wektory wirusowe, wzbudzające długotrwałą ekspresję transgeny, powodują wbudowanie go w losowe miejsca w ludzkim genomie, umożliwiając tym samym powstanie mutacji insercyjnych. Z powodu tak wielu niedogodności i zagrożeń, wirusowy transfer stosuje się przeważnie w terapiach *ex vivo*, jednocześnie poszukując alternatywy w postaci niewirusowego transferu genów [6].

2. Niewirusowy transfer genów – wykorzystanie plazmidów

Niewirusowy transfer genów w głównej mierze oparty jest na wykorzystaniu plazmidów, czyli kolistych cząsteczek, najczęściej dwuniciowego DNA, jako nośników dla genów terapeutycznych. Cząsteczki te posiadają możliwość replikacji niezależnej od replikowania się chromosomów. Posiadają wielkość mieszczącą się w przedziale od 200bp do 100000bp. Wektory rekombinowane oparte na plazmidach mają jednak wielkość ok. 10000bp [7]. Ze względu na

¹ arkadiusz_goede@wp.pl, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Wydział lekarski, Katedra i Zakład Genoterapii

spory rozmiar, ujemny ładunek oraz hydrofilowość plazmidowego DNA, plazmidy nie posiadają zdolności do samoistnego przenikania przez błony komórkowe. By umożliwić transport plazmidów do wnętrza komórek przeprowadza się ich kondensację z cząsteczkami innych nośników, lub też wykorzystuje się różne czynniki fizyczne np. elektroporację czy sonikację [8].

Kaseta ekspresyjna typowego wektora plazmidowego składa się z promotora i transgenu, często w postaci cDNA, oraz sygnału poliadenylacji. W jej składzie może się również znaleźć wzmacniacz, którego zadaniem jest intensyfikacja transkrypcji. Promotor, wspomniany jako pierwszy, wiąże czynniki transkrypcyjne oraz polimerazę RNA. Zapewnia to wydajną ekspresję genu terapeutycznego. Najczęściej stosowanymi promotorami, które dają wysoki poziom ekspresji są promotory wirusowe np. promotor wirusa SV40 (*ang. Simian Virus 40*), RSV (*ang. Respiratory Syncytial Virus*) oraz CMV (*ang. Cytomegalowirus*) [9]. Innymi typami wykorzystywanych promotorów są promotory tkankowo-swoiste oraz indukowalne. Poziom wywołanej przez nie ekspresji nie jest tak wysoki, dlatego zazwyczaj naturalne promotory modyfikuje się przez zwielokrotnienie lub łączenie niektórych elementów pochodzących z różnych promotorów.

Tabela 1. Przegląd przykładowych promotorów specyficznych dla określonych komórek [10, zmodyfikowano]

Miejsce docelowe	Promotor (pochodzenie)
Melanocyty	Tyrozynaza
Neurony	Enolaza specyficzna dla neuronów (NSE)
Wątroba	Albumina
Tkanka mięśniowa	Mięśniowa kinaza kreatyninowa (MCK)
Komórki glejowe	Zasadowe białko mieliny (MBP)

W terapii nowotworów znalazły zastosowanie promotory nowotworowoswoiste. Zawierają elementy, których aktywacja przebiega po zastosowaniu promieniowania jonizującego, chemioterapeutyków lub wyższej temperatury.

Tabela 2. Przegląd przykładowych promotorów specyficznych dla typu nowotworu [10 zmodyfikowano]

Rodzaj nowotworu	Promotor
Rak sutka	erbB2; Mucyna-1 (Muc-1); α -Laktoalbumina (ALA); β -Laktoglobulina (BLG)
Rak wątroby	α -Fetoproteina
Rak trzustki	erbB2
Rak jajnika	Inhibitor leukoproteinazy (SLPI)
Guz lity	Elementy aktywowane hipoksją (HRE)
Gruzołakoraki (sutka, płuc, jelita)	Antygen nowotworowo-embryonalny (CEA)
Kostniakomięsak, rak prostaty	Osteokalcyna

Kaseta ekspresyjna może zawierać więcej niż jeden gen. Geny mogą być kontrolowane przez niezależne od siebie promotory, które osłabiają się wzajemnie, lub mogą być przedzielone sekwencją IRES (*ang. Internal Ribosome Entry Site*). W drugim przypadku występuje tylko jeden promotor, co jest bardziej korzystnym rozwiązaniem. Sekwencja IRES jest wewnętrznym miejscem wiązania rybosomów umożliwiającym rozpoczęcie translacji w środkowej części nici mRNA. Powstaje jeden transkrypt, na którego podstawie syntezowane są dwa białka kodowane przez dwa geny rozdzielone sekwencją IRES [11]. Drugim genem jest najczęściej gen reporterowy (GFP *ang. Green Fluorescence Protein*; lub np. gen β -galaktozydazy) umożliwiający ocenę poziomu transfekcji oraz ekspresji transgeny w komórkach [12] lub gen oporności na antybiotyki (ampicylina, neomycyna) pozwalający na wyselekcjonowanie komórek zawierających dany wektor plazmidowy [10].

Poza kasetą ekspresyjną typowy wektor plazmidowy zawiera sekwencje *ori*, (*f1ori*), która umożliwia replikację w komórkach bakteryjnych, a także sekwencję *SV40ori* potrzebną do replikacji w komórkach eukariotycznych [10].

Najczęściej wykorzystywanymi bakteriami w procesie namnażania wektorów są bakterie *E. coli*. W związku z tym w wektorach plazmidowych występuje najczęściej gen *ColE1* regulujący cykl replikacyjny tych bakterii.

3. Fizyczne metody wprowadzania plazmidowego DNA

3.1. Iniekcja nagiego plazmidowego DNA

Wykorzystanie bezpośredniej iniekcji plazmidowego DNA zakłada wprowadzenie wektora plazmidowego przez fizyczne uszkodzenie błony komórkowej przez igłę. Metoda ta cechuje się prostotą i bezpieczeństwem, jednak uzyskuje się stosunkowo małą ekspresję wprowadzanego transgenu. Dlatego też w celu zwiększenia ekspresji badano możliwość użycia środków takich jak niejonowe polimery, transferyna, rozpuszczalniki mieszające się z wodą, inhibitory nukleaz oraz środki powierzchniowo czynne [13, 14]. Przez bezpośrednią iniekcję wprowadzano już plazmidowy DNA do komórek mięśni, skóry wątroby oraz mózgu. Dzięki badaniom Song'a K. i wsp. dowiedziono, że wprowadzenie DNA kodującego IL27 i CEA (*ang. Carcinoembryonic Antygen*) do komórek mięśni metodą iniekcijną poprawiało odporność przeciwnowotworową [15]. Losordo D. poprzez wprowadzenie tą metodą VEGF (*ang. Vascular Endothelial Growth Factor*) do mięśnia sercowego poprawili wydajność jego pracy.

Odmianą bezpośredniej iniekcji plazmidowego DNA jest zastosowanie strzykawki bezigłowej (*ang. Jet Iniection*). Strumień roztworu DNA napędzany jest przez aparat dzięki sprężonemu dwutlenkowi węgla. Poprzez powstałe w błonie komórkowej pory możliwy jest transfer genów do wnętrza komórki. Wykorzystanie aparatu bezigłowego zapewnia 50 razy większą ekspresję wprowadzanego transgenu niż metoda z wykorzystaniem igły [16, 17]. Badano możliwość zastosowania tej metody do transferu genów do komórek raka skóry jako rozwiązania wspomagającego chemioterapię [18].

3.2. Metoda hydrodynamiczna

Metoda hydrodynamiczna zakłada wykorzystanie wysokiego ciśnienia do wprowadzenia wektorów plazmidowych. Wprowadzane zostają bardzo duże objętości DNA w krótkim czasie. Jest to metoda uznana za najskuteczniejszą z metod niewirusowych służących wprowadzaniu genów do komórek gryzoni. Efektywną transfekcję uzyskano wprowadzając tą metodą geny do komórek narządów gryzoni takich jak: wątroba, nerki, serce i płuca [19, 20]. Zastosowanie tej metody umożliwia uzyskanie ekspresji wprowadzanego genu porównywalnej z poziomami obserwowanymi w warunkach fizjologicznych. Niestety ze względu na znaczne objętości wprowadzanego roztworu DNA, metoda ta jest zbyt inwazyjna dla ludzi. By rozwiązać ten problem, metodę tą zmodyfikowano poprzez wprowadzenie do naczyń krwionośnych cewnika balonowego, który poprzez lokalne zahamowanie przepływu krwi, umożliwia uzyskanie wysokiego stężenia wprowadzanego DNA w interesującym nas miejscu. Zastosowanie tego typu rozwiązania daje perspektywy dla wykorzystania tej metody w leczeniu ludzi [21, 22].

3.3. Pistolet genowy

Pistolet genowy wykorzystuje, wysokie ciśnienie gazu, zwykle helu, do napędzania cząsteczek metali ciężkich takich jak: złoto, srebro czy wolfram, opłaszczonych materiałem genetycznym, który powinien zostać wprowadzony do komórek docelowych. Metoda ta nadaje się do wprowadzania genów do komórek skóry, mięśni, litych guzów nowotworowych. Zapewnia większą odpowiedź immunologiczną niż po zastosowaniu iniekcji nagiego plazmidowego DNA. Niestety zastosowanie pistoletu genowego ograniczone jest jedynie do tkanek łatwo dostępnych [23].

3.4. Elektroporacja

W przypadku tej metody transfer materiału genetycznego do wnętrza komórek zachodzi poprzez wykorzystanie impulsów elektrycznych, o wysokim napięciu, wywołujących zmiany w przepuszczalności błon komórkowych. Następuje pominięcie procesu endocytozy, a efektywność transferu genów, jaką można osiągnąć jest stosunkowo duża. Niestety, z zastosowaniem tej metody wiąże się problem z optymalizacją procedury, dużą śmiertelnością komórek wrażliwych na wysokie napięcie. Ponadto dodatkowym ograniczeniem tej metody są spore trudności w dostarczeniu elektrod do narządów wewnętrznych chorego [24, 25].

3.5. Sonikacja

Sonikacja jest metodą bardzo zbliżoną do wspomnianej wcześniej elektroporacji. Jednakże w tym przypadku pory w błonie komórkowej nie tworzą się na skutek działania impulsów elektrycznych, ale przy udziale fal ultradźwiękowych, które rozbijają mikropęcherzyki wypełnione powietrzem i stabilizowane przez cząsteczki powierzchniowo czynnych albumin i fosfolipidów. Absorpcja fal ultradźwiękowych przez mikropęcherzyki doprowadza do ich pęknięcia i powstania lokalnych fal uderzeniowych, które sprzyjają powstawaniu porów w błonie komórek [26, 27]. Sonikacja cechuje się bezpieczeństwem stosowania, nieinwazyjnością oraz umożliwia transfer genów do mniej dostępnych tkanek, bez konieczności przeprowadzania chirurgicznej procedury. Tsunoda i wsp. oraz Sheyna i wsp. wykazali efektywność tej metody transferu genów do tkanki kostnej i mięśnia sercowego [28, 29].

4. Chemiczne metody wprowadzania plazmidowego DNA

Chemiczne metody transferu genów terapeutycznych zakładają użycie nośników powstałych na bazie syntetycznych związków chemicznych lub wysoko oczyszczonych substancji pochodzenia naturalnego. Nośniki te wykazują duże bezpieczeństwo stosowania, jednak wydajność transferu genów niejednokrotnie jest niezadawalająca. Podstawowym zadaniem nośników syntetycznych jest kondensacja DNA oraz zniwelowanie jego ładunku ujemnego [30].

4.1. Nośniki lipidowe

Nośniki lipidowe należą do rodziny nośników syntetycznych. W ich skład wchodzi lipidy oraz lipidy kationowe. Te ostatnie mają postać dwuwarstwowych struktur sferycznych. W ich skład wchodzi cząsteczki lipidowe o ładunku dodatnim oraz obojętnym. „Głowa” jest naładowana dodatnio i ma za zadanie wiązać naładowane ujemnie grupy fosforanowe kwasów nukleinowych. „Ogony” są strukturami hydrofobowymi zbudowanymi przeważnie z dwóch rodzajów ugrupowań hydrofobowych, cholesterolu, alifatycznych łańcuchów lub innych rodzajów steroidowych pierścieni. Naładowane dodatnio liposomy wiążą się z ujemnie naładowanymi cząsteczkami kwasów nukleinowych, tworząc struktury zwane lipopleksami. Cząsteczki DNA otoczone przez dodatnio naładowane lipidy są tym samym chronione przed degradacją przez nukleazy [31, 32]. W licznych badaniach, tak otrzymane kompleksy podawano podskórnym, śródskórnym, doustnym, dootrzewnowo oraz do dróg oddechowych. Możliwość podania lipidów połączonych z DNA do krwiobiegu jest ograniczona ze względu na tworzenie agregatów z ujemnie naładowanymi cząsteczkami surowicy lub komponentami komórkowymi takimi jak: eryocyty, płytki krwi. Czas egzystencji kompleksów w krwiobiegu jest niezwykle krótki, dlatego w celu jego wydłużenia lipidy kationowe opłaszczają się obojętnymi polimerami hydrofilowymi, takimi jak glikol polietylenowy (PEG; *ang. Polyethylene Glycol*). Zabieg opłaszczania wpływa jednak negatywnie na oddziaływanie nośnika z błoną komórek, a tym samym obniża efektywność transferu genów do wnętrza komórek docelowych. Innym zadaniem PEG jest obniżenie ryzyka wystąpienia niekontrolowanej reakcji układu odpornościowego jako odpowiedzi na wprowadzenie do organizmu nośnika.

4.2. Polimery kationowe

Oprócz nośników lipidowych do syntetycznych nośników zaliczają się również polimery kationowe. Połączenie tych nośników z DNA skutkuje powstaniem polipleksów, będących strukturami bardziej stabilnymi niż lipopleksy. Największą wydajnością spośród nośników opartych na polimerach kationowych zdaje się cechować PEI (*ang. Polyethylenimine*) – polietylenoimina, która może mieć formę liniową lub rozgałęzioną. Ładunek całego kompleksu PEI-DNA zbliżony jest do obojętnego, pomimo dużej gęstości ładunku dodatniego na polietylenoiminie. Przewagę polipleksom nad lipopleksami daje większa wydajność transferu DNA oraz obojętność pod względem ładunku, skutkująca brakiem oddziaływań z ujemnie naładowanymi białkami osocza, czy też składnikami macierzy komórkowej. Polipleksy przygotowane na podstawie liniowych form PEI wykazują niższą toksyczność i wyższy stopień transfekcji w porównaniu do tych stworzonych na bazie PEI o rozgałęzionej strukturze [33–36]. Na wysoką wydajność transfekcji ma wpływ

prawdopodobnie osmotyczne pęknięcie endosomów, które zawierają kompleksy z DNA (efekt gąbki protonowej) [37, 38]. Uwalnianiu kompleksów zawierających DNA do cytoplazmy sprzyja efekt wzmożonej lizy endosomalnej. Podanie układowe niewielkich cząsteczek polipleksów powoduje powstawanie agregatów i odkładnie się ich w tkankach między innymi wątroby i płuc. Polipleksy często sprzęga się z PEG lub dekstranem w celu zmniejszenia indukcji cytokin i ograniczenia ryzyka powstania oddziaływań niespecyficzych [39].

Tabela 3. Przegląd przykładowych lipidów używanych do transferu genów

Skrót	Pełna nazwa lipidu
DOSPA	Trójfluorooctan 2,3-dioleoyloksy-N-[sperminokarboksaminoetylo]-N,Ndimetylo-1-propaminy
DOGS	Dioktadecyloamidoglicylospermina
DDAB	Bromek dimetylodiokta-decyloamoniowy
DOTMA	Chlorek N-[1-(2,3-dioleiloksy)propylo]-N,N,N-trimetyloamoniowy
DMIRE	Bromek 1,2-dimirystyloksypropylo-3-dimetylohydroksyetyloamoniowy
DOTAP	1,2-diacylo-3-trimetyloaminopropan
Arg-Chol	ω -BOC-argininoglicynian cholesterolu
DC-Chol	3([N-(N' dimetyloaminoetano)karbamilo]cholesterol

4.3. Dendrymery

Dendrymery są rozgałęzionymi polimerami o jednorodnym rozmiarze i rozkładzie ładunków. Na zewnętrznej warstwie dendrymerów występują grupy aminowe, których dodatni ładunek pozwala na wydajne kompleksowanie i kondensację DNA. Z zastosowaniem dendrymerów nie wiąże się odpowiedź układu immunologicznego. Połączenie tych cząsteczek z plazmidami skutkuje powstaniem sferycznych struktur dobrze rozpuszczalnych w środowisku wodnym [40].

4.4. Nanocząsteczki

Wykonane są z substancji nieorganicznych takich jak: metale (złoto, żelazo, srebro), ceramiki (węglan lub fosforan wapnia, magnezu, krzemu) lub sole nieorganiczne [41]. Powierzchnia nanocząsteczek często pokrywana jest związkami, które wspomagają wiązanie kwasów nukleinowych lub ukierunkowują dostarczanie genów do odpowiednich miejsc. Zaletą nanocząsteczek jest ich niewielki rozmiar, umożliwiający pominięcie fizjologicznych i strukturalnych barier w komórce, powodując tym samym wysoką ekspresję wprowadzanego genu terapeutycznego [42]. Kompleksy nanocząsteczek z DNA mogą być transportowane przez błony komórkowe w dwojaki sposób: przez specyficzny receptor membrany, lub za pomocą nukleoliny. Drugie z wymienionych białek dostarcza cząsteczki bezpośrednio do jądra komórkowego z pominięciem drogi endosomalnej [43]. Metoda ta umożliwiła transfekcję komórek postmitotycznych *in vivo* i *in vitro*, nie wykazuje toksyczności oraz nie wzbudza odpowiedzi immunologicznej [44].

4.5. Ograniczenia metod chemicznych

Zmieszanie plazmidowego DNA z nośnikami liposomowymi czy polimerowymi skutkuje całkowitym związaniem materiału genetycznego oraz jego kondensacją. Kompleksy DNA-nośnik powinny cechować się niewielkim ładunkiem dodatnim, który pozwoli na interakcję nośnika z ujemnie naładowaną błoną komórkową. Niestety zastosowanie takich kompleksów ogranicza się do podawania miejscowego, gdyż wprowadzone do krwiobiegu oddziałują z ujemnie naładowanymi opsoninami, co doprowadza do usunięcia kompleksów w procesie fagocytozy przez komórki żerne w wątrobie i śledzionie. Z zastosowaniem takiego typu kompleksów wiąże się ryzyko aktywowania systemu dopełniacza oraz modyfikacji cech fizykochemicznych krwi (np. lepkości) [10]. Transport kompleksów kwasów nukleinowych z nośnikami zachodzi na drodze endocytarnej lub dzięki fuzji przez zdestabilizowaną błonę komórkową. Na wydajność transfekcji ma wpływ rozmiar kompleksów oraz ich wypadkowy ładunek. W drodze endosomalnej, po przejściu przez błonę komórkową, kompleksy muszą zostać uwolnione z pęcherzyków endocytarnych, by nie uległy degradacji na skutek działania enzymów litycznych. Fuzja kompleksów DNA-nośnik przez błonę jądrową jest zjawiskiem niezwykle rzadkim. DNA może wnikać do jądra na dwa sposoby: pasywnie, podczas podziałów komórkowych, lub aktywnie dzięki sygnałowi lokalizacji jądrowej (NLS; *Nuclear Localization Signal*), który jest rozpoznawany przez receptory jądrowe z rodziny importyn [45].

4.6. Metody chemiczne – podsumowanie

Wydajność transfekcji komórek plazmidowym DNA w kompleksach z nośnikami lipidowymi czy polimerowymi zależy od szeregu czynników takich jak: transport niezdegradowanych kompleksów do jądra komórki, wydajny transport przez błonę komórkową, uwalnianie kompleksów z pęcherzyków endosomalnych, stabilność kompleksów w cytoplazmie, wnikanie plazmidów do jądra, zajście transkrypcji i ekspresja transgenu. Wydajność transfekcji z wykorzystaniem niewirusowego transferu ściśle zależy od faz cyklu komórkowego. Największą efektywność obserwuje się w fazie S oraz G2.

5. Białka CPPs (ang. Cell-penetrating peptides)

Inną nazwą, pod jaką funkcjonują CPPs, to białkowe domeny transdukcyjne PTDs (ang. *Protein Transduction Domains*). Białka penetrujące komórki należą do krótkich, amfipatycznych, kationowych peptydów. Posiadają możliwość szybkiego przemieszczania się przez błony komórkowe [46, 47]. Cechuje je bardzo duża zmienność sekwencji aminokwasowej, jednak w ich składzie przewagę stanowi lizyna i arginina [48]. Nierzadko białka tego typu posiadają możliwość tworzenia α -helikalnych struktur [49].

Istnieją trzy grupy CPPs, które różnią się między sobą ze względu na pochodzenie białek. Pierwszą grupę stanowią cząsteczki pochodzące od białek zdolnych do transdukcji. W tej grupie znajduje się białko Tat (ang. *Transactivating Transcriptional Activator*), dzięki któremu transport terapeutycznych molekuł do komórek, za sprawą wykorzystania białek przenośnikowych, stał się obiecującym narzędziem w nieinwazyjnym systemie transportu przez błony komórkowe [49]. Do drugiej grupy zaliczamy peptydy syntetyczne, zaprojektowane tak by naśladowały strukturę znanych peptydów występujących naturalnie. Składają się z powtarzających się sekwencji aminokwasów jak w modelu amfipatycznych peptydów MAP (ang. *Multiple Antigenic Peptides*) [50]. W skład trzeciej grupy wchodzi chimeryczne CPPs. Są zbudowane z dwóch ugrupowań, które pochodzą z różnych peptydów [51]. W tej grupie znajdziemy białka takie jak Tat-LK15.

Szerokie zainteresowanie CPPs związane jest z ich zdolnością do przenikania przez błony komórkowe w procesach nie wywołujących toksyczności [52]. Proces przekraczania dwuwarstwy lipidowej, otaczającej komórki, przez CPPs jest przypuszczalnie niezależny od receptorów błonowych i dostarczanej energii [53, 54]. Według najnowszych badań CPPs mogą przenikać przez błony komórkowe na drodze wykorzystującej endocytozę, lub od niej niezależnej. Dokładny mechanizm internalizacji nie jest jednak znany i pozostaje przedmiotem wielu badań i spekulacji [52].

Tabela 4. Sekwencja aminokwasowa wybranych CPPs

Białko	Sekwencja aminokwasowa
Penetratin	RQIKIWFQNRMMKWKK
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKISIL
MPG	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV
Tat	RKKRRQRRRGGG
LK15	KLLKLLKLLKLLK
Tat-LK15	RKKRRQRRRGGGKLLKLLKLLKLLK

Większość białek CPPs cechuje się znacznym, dodatnim ładunkiem elektrycznym oraz dużą amfipatycznością. Obie te cechy są bardzo istotne podczas transportu przez błonowego. Wysoki dodatni ładunek pozwala na oddziaływanie peptydu z ujemnie naładowaną błoną komórkową wykorzystując do tego celu oddziaływania elektrostatyczne. Amfipatyczność tych białek pozwala im zakłócić organizację bony komórkowej, doprowadzić do jej dezorganizacji lub przejściowego powstania porów pomocnych w penetracji komórek [55-57].

Internalizacja białek CPPs w niskich temperaturach pozwala przypuszczać, że mechanizm odpowiedzialny za wychwyt i transport białek do wnętrza komórek nie zależy od endocytozy. Badanie przeprowadzone przy wykorzystaniu enancjomerów D i L oraz peptydów o odwróconej i nieodwróconej sekwencji pozwala stwierdzić brak uczestnictwa receptorów błonowych w procesie transportu przez błonowego [49]. Najnowsze badania jednak dowodzą, że oprócz bezpośredniej internalizacji, dochodzi również do translokacji drogą endocytarną z wykorzystaniem kaweoli, klatryn i makropinocytozy, w szczególności dla CPPs połączonych z cząsteczkami o dużej masie [52]. Stwierdzono również istnienie różnic pomiędzy internalizacją samych białek przenośnikowych i kompleksów tych białek z kwasami nukleinowymi [49]. W toku wielu spekulacji powstało kilka modeli przedstawiających zjawisko bezpośredniego transportu CPPs przez dwuwarstwę lipidową. Wyróżniamy model pierścieniowych porów (*ang. Toroidal Pores Model*), klepek beczki (*ang. Barrel Stave Pore Model*), oraz model dywanowy (*ang. Carpet Model*) [49, 58, 59]. Wszystkie wyżej wymienione modele translokacji peptydów zakładają obszerną destabilizację błony komórkowej, jednak niska cytotoksyczność pozwala stwierdzić, iż żaden z tych modeli nie wyjaśnia całkowicie przez błonowego transportu białek CPPs. Istnieje zatem alternatywny mechanizm, który pozostaje zagadką do dnia dzisiejszego.

5.1. Mechanizm translokacji białek przenośnikowych CPPs – badania własne

Próba zbadania mechanizmu internalizacji białek przenośnikowych zajął się zespół badawczy w Katedrze i Zakładzie Genoterapii CM UMK. Badanie przeprowadzono wykorzystując peptyd Tat-LK15. Dziewięcio-aminokwasowa sekwencja pobrana z białka Tat (49-57; RKKRRQRRR) posiadała duży ładunek dodatni, pozwalający na silne wiązanie z błoną komórkową [60, 61]. LK15 zbudowany jest z dwóch podtypów aminokwasów: hydrofilowej lizyny o ładunku dodatnim i hydrofobowej niepolarniej leucyny. Struktura tego peptydu jest silnie amfipatyczna. Przez wzgląd na α -helikalną strukturę LK-15 wykazuje aktywność lityczną względem błon komórkowych posiadając przy tym zdolność kondensacji cząsteczek DNA. W badaniu do transferu genów użyto peptydu powstałego po syntetycznym połączeniu Tat-LK15. Podjęto próbę transferu plazmidowego DNA kodującego GFP do komórek linii nowotworowych A-549 oraz H-92. Sam transfer przeprowadzano w niskiej temperaturze, blokując tym samym endocytarną drogę podczas transportu przez błonę. Uzyskany bardzo niski stopień transfekcji pozwolił zasugerować, iż duże kompleksy Tat-LK15-DNA przemieszczają się przez błonę drogą z wykorzystaniem procesu endocytozy.

Literatura:

- [1] Kochanek S., *High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy*, Human Gene Therapy, 1999 vol. 10, s. 2451-2459
- [2] Kim I. H., Jozkowicz A., Piedra P. A., Oka K., Chan L., *Lifetime correction of genetic deficiency in mice with a single injection of helper-dependent adenoviral vector*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001 vol. 98, s. 13282-13287
- [3] Stopa M., Dulak J., Józkowicz A., *Najważniejsze cechy wektorów adenowirusowych*, Biotechnologia, 2007 vol. 3, s. 22-32
- [4] Stopa M., Jaźwa A., Mleczko K., Dulak J., Józkowicz A., *Produkcja wektorów adenowirusowych pierwszej generacji – optymalizacja metody*, Biotechnologia, 2007 vol. 3, s. 98-122
- [5] Qian C., Drozdziak M., Caselmann W. H., Prieto J., *The potential of gene therapy in the treatment of hepatocellular carcinoma*, Journal of Hepatology, 2000 vol. 32, s. 344-351
- [6] Ponder K. P., *Gene therapy for hemophilia*, Current Opinion of Hematology, 2006 vol. 13, s. 301-307
- [7] Brown T. A., *Genomy*, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2001.
- [8] Cotton M., Wagner E., *Non-viral approaches to gene therapy*, Current Opinion in Biotechnology, 1993 vol. 4, s. 705-710
- [9] Józkowicz A., Dulak J., *Nowe strategie wykorzystania wektorów plazmidowych wirusowychw terapii genowej*, Biotechnologia, 2007 vol. 3, s. 7-21
- [10] Szala S. *Terapia genowa*, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003

- [11] Vagner S., Galy B., Pyronnet S., *Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites*, *EMBO reports*, 2001 vol. 2, s. 893-898
- [12] Śliwińska E., *Białko zielonej fluorescencji (GFP) – ekologiczny marker transformacji genetycznej i narzędzie do obserwacji procesów w żywej komórce*, *Biotechnologia*, 2002 vol. 56, s. 129-135
- [13] Sato Y., Yamauchi N., Takahashi M., Sasaki K., Fukaura J. i wsp., *In vivo gene delivery to tumor cells by transferring – streptavidin–DNA conjugate*, *Faseb Journal*, 2000 vol. 14, s. 2108-18
- [14] Greco O., Scott S. D., Marples B., Dachs G. U., *Cancer gene therapy: delivery, delivery, delivery*, *Frontiers in Bioscience*, 2002 vol. 7, s. 1516-1524
- [15] Losordo D. W., Vale P. R., Hendel R. C., Milliken C. E., Fortuin F. D. i wsp., *Phase 1/2 placebo-controlled, doubleblind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia*, *Circulation*, 2002 vol. 105 s. 2012-2018
- [16] Ren S., Li M., Smith J. M., DeTolla L. J., Furth P. A., *Low-volume jet injection for intradermal immunization in rabbits*, *BMC Biotechnology*, 2002 vol. 2:10
- [17] Cartier R., Ren S. V., Walther W., Stein U., Lewis A. i wsp., *In vivo gene transfer by low-volume jet injection*, *Analytical Biochemistry*, 2000 vol. 282, s. 262-265
- [18] Stein U., Walther W., Stege A., Kaszubiak A., Fichtner I., Lage H., *Complete in vivo reversal of the multidrug resistance phenotype by jet-injection of anti-MDR1 short hairpin RNA-encoding plasmid DNA*, *Molecular Therapy*, 2008 vol. 16, s. 178-186
- [19] Zhang G., Gao X., Song Y. K., Vollmer R., Stolz D. B. i wsp., *Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery*, *Gene Therapy*, 2004 vol. 11, s. 675-82
- [20] Zhang G., Song Y. K., Liu D., *Long-term expression of human alpha1 antitrypsin gene in mouse liver achieved by intravenous administration of plasmid DNA using a hydrodynamics-based procedure*, *Gene Therapy*, 2000 vol. 7, s. 1344-1349
- [21] Fabre J. W., Grehan A., Whitehorne M., Sawyer G. J., Dong X. i wsp., *Hydrodynamic gene delivery to the pig liver via an isolated segment of the inferior vena cava*, *Gene Therapy*, 2008 vol. 15, s. 452-462
- [22] Suda T., Suda K., Liu D., *Computer-assisted hydrodynamic gene delivery*, *Molecular Therapy*, 2008 vol. 16, s. 1098-1104
- [23] Uchida M., Natsume H., Kobayashi D., Sugibayashi K., Morimoto Y., *Effects of particle size, helium gas pressure and microparticle dose on the plasma concentration of indomethacin after bombardment of indomethacin-loaded poly-L-lactic acid microspheres using a Helios gun system*, *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 2002 vol. 25, s. 690-693
- [24] Titomirov A. V., Sukharev S., Kistanova E., *In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1991 vol. 1088, s. 131-134
- [25] Andre F., Mir L. M., *DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications*, *Gene Therapy*, 2004 vol. 11, s. 33-42.
- [26] ter Haar G., *Therapeutic applications of ultrasound*, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2007 vol. 93, s. 111-129
- [27] Endoh M., Koibuchi N., Sato M., Morishita R., Kanzaki T. i wsp., *Fetal gene transfer by intrauterine injection with microbubble-enhanced ultrasound*, *Molecular Therapy*, 2002 vol. 5, s. 501-508

- [28] Tsunoda S., Mazda O., Oda Y., Iida Y., Akabame S. i wsp., *Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005 vol. 336, s. 118-127
- [29] Sheyn D., Kimelman-Bleich N., Pelled G., Zilberman Y., Gazit D., Gazit Z., *Ultrasound-based nonviral gene delivery induces bone formation in vivo*, Gene Therapy, 2008 vol. 15, s. 257-266
- [30] Morille M., Passirani C., Vonarbourg A., Clavreul A., Benoit J. P., 2008. *Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer*, Biomaterials, 2008 vol. 29, s. 3477-3496
- [31] Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W. i wsp., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987 vol. 84, s. 7413-7417
- [32] Wasungu L., Hoekstra D., *Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes*, Journal of Controlled Release, 2006 vol. 116, s. 255-264
- [33] Fischer D., Bieber T., Li Y., Elsässer H. P., Kissel T., *A novel nonviral vector for DNA delivery based on low molecular weight, branched polyethylenimine: effect of molecular weight on transfection efficiency and cytotoxicity*, Pharmaceutical Research, 1999 vol. 16, s. 1273-1279
- [34] Gosselin M. A., Guo W., Lee R. J., *Efficient gene transfer using reversibly cross-linked low molecular weight polyethylenimine*, Bioconjugate Chemistry, 2001 vol. 12, s. 989-994
- [35] Goula D., Benoist C., Mantero S., Merlo G., Levi G., Demeneix B. A., *Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung*, Gene Therapy, 1998 vol. 5, s. 1291-1295
- [36] Wightman L., Kircheis R., Rössler V., Carotta S., Ruzicka R. i wsp., *Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo*, The Journal of Gene Medicine, 2001 vol. 3, s. 362-372
- [37] Akinc A., Thomas M., Klibanov A. M., Langer R., *Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis*, The Journal of Gene Medicine, 2005 vol. 7, s. 657-663
- [38] Yamashiro D. J., Fluss S. R., Maxfield F. R., *Acidification of endocytic vesicles by an ATP-dependent proton pump*, The Journal of Cell Biology, 1983 vol. 97, s. 929-934
- [39] Hwang S. J., Davis M. E., *Cationic polymers for gene delivery: designs for overcoming barriers to systemic administration*, Current Opinion in Molecular Therapeutics, 2001 vol. 3, s. 183-191
- [40] Zinselmeyer B. H., Mackay S. P., Schatzlein A. G., Ucheqbu I. F., *The lower-generation polypropylenimine dendrimers are effective gene-transfer agents*, Pharmaceutical Research, 2002 vol. 19, s. 960-967
- [41] Sokolova V., Epple M., *Inorganic nanoparticles as carriers of nucleic acids into cells*, Angewandte Chemie International ed. in English, 2008 vol. 47, s. 1382-1395
- [42] Cai X., Conley S., Naash M., *Nanoparticle applications in ocular gene therapy*, Vision Research, 2008 vol. 48, s. 319-324
- [43] Davis P. B., Cooper M. J., *Vectors for airway gene delivery*, AAPS Journal, 2007 vol. 9, s. 11-17
- [44] Al-Dosari M. S., Gao X., *Nonviral Gene Delivery: Principle, limitations, and recent progress*, AAPS Journal, 2009 vol. 11, s. 671-681
- [45] Chook Y. M., Süel K. E., *Nuclear import by karyopherin- β s: recognition and inhibition*, Biochimica et Biophysica Acta, 2011 vol. 1813, s. 1593-1606

- [46] Joliot A., Prochiantz A., *Transduction peptides: from technology to physiology*, Nature Cell Biology, 2004 vol. 6, s. 189-196
- [47] Trehin R., Merkle H. P., *Chances and pitfalls of cell penetrating peptides for cellular drug delivery*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2004 vol. 58, s. 209-223
- [48] Uchida T., Kanazawa T., Takashima Y., Okada H., *Development of an efficient transdermal delivery system of small interfering RNA using functional peptides, Tat and AT-1002*, Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2011 vol. 59, s. 196-201
- [49] Trabulo, S., Cardoso, A. L., Mano, M., De Lima M. C. P., *Cell-Penetrating Peptides –Mechanisms of Cellular Uptake and Generation of Delivery Systems*, Pharmaceuticals, 2010 vol. 3, s. 961-993
- [50] Eiríksdóttir E., Konate K., Langel U., Divita G., Deshayes S., *Secondary structure of cell-penetrating peptides controls membrane interaction and insertion*, Biochimica et Biophysica Acta, 2010 vol. 1798, s. 1119-1128
- [51] Zorko M., Langel U., *Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2005 vol. 57, s. 529-545
- [52] Bolhassani A., *Potential efficacy of cell-penetrating peptides for nucleic acid and drug delivery in cancer*, Biochimica et Biophysica Acta, 2011 vol. 1816, s. 232-246
- [53] Sawant R., Torchilin V., Raagel H., Saalik P., Pooga M. i wsp., *Intracellular transduction using cell-penetrating peptides*, Molecular BioSystem? 2009 vol. 6, s. 628-640
- [54] Fonseca S. B., Pereira M. P., Kelley S. O., *Recent advances in the use of cellpenetrating peptides for medical and biological applications*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2009 vol. 61, s. 953-964
- [55] Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S. i wsp., *Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery*, The Journal of Biological Chemistry, 2001 vol. 276, s. 5836-5840
- [56] Oehlke, J., Scheller A., Wiesner B., Krause E., Beyermann M. i wsp., *Cellular uptake of an α -helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically*, Biochimica et Biophysica Acta, 1998 vol. 1414, s. 127-139
- [57] Wender P. A., Mitchell D. J., Pattabiraman K., Pelkey E. T., Steinman L., Rothbard J. B., *The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000 vol. 97, s. 13003-13008
- [58] Al-kotaji, Mayasar A., *The multifunctional peptide, Tat-LK15: A study of its cellular uptake and its potential use in drug delivery*. A thesis submitted to the University of Manchester for the degree of PhD in the Faculty of Medical and Human Sciences, 2012
- [59] Shai Y., *Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides*, Biochimica et Biophysica Acta, 1999 vol. 1462, s. 55-70
- [60] Brooks H., Lebleu B., *Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics*, Advanced Drug Delivery Reviews, 2005 vol. 57, s. 559-577
- [61] Kaplan I. M., Wadia J. S., Dowdy S. F., *Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis*, Journal of Controlled Release, 2005 vol. 102, s. 247-253

Niewirusowy transfer genów – przegląd metod

Streszczenie:

Wirusowy transfer genów jest obecnie dominującym sposobem dostarczania terapeutycznego materiału genetycznego w strategiach terapii genowej. Jednakże z racji na szereg wad i niedogodności wynikających z jego stosowania coraz częściej poszukuje się alternatywnych metod wprowadzania DNA do komórek. Na przestrzeni lat opracowano szereg metod fizycznych i chemicznych zaliczanych do niewirusowego transferu genów. Możemy do nich zaliczyć takie techniki jak: sonikacja, elektroporacja, nośniki lipidowe czy polimery kationowe. Niestety każda z tych metod posiada swoje ograniczenia, które istotnie zawężają możliwości zastosowania ich w leczeniu ludzi. Duże nadzieje wiąże się ze stosunkowo słabo poznanymi białkami przenośnikowymi CPPs, które w przyszłości mogą stać się głównymi nośnikami genów terapiach *in vivo*. Autorzy niniejszej publikacji podjęli się próby zbadania mechanizmu internalizacji tego typu peptydów na podstawie białka fuzyjnego Tat-LK15. Uzyskane wyniki rzucają nowe światło na mechanizm przezbłonowego przenoszenia materiału genetycznego przez wyżej wymienione białka, który najprawdopodobniej zachodzi na drodze endocytarnej. Niewirusowy transfer genów to wciąż dynamicznie rozwijające się zagadnienie, które budzi ogromne nadzieje na przyszłość.

Słowa kluczowe: terapia genowa, transfer genów, plazmidy, CPPs

Non-viral gene transfer – a review of methods

Abstract:

Viral gene transfer is now the dominant way to deliver therapeutic genetic material in a gene therapy approaches. However, due to a number of disadvantages and limitations, scientists are looking for alternative methods for introducing DNA into cells. Over the years a large number of chemical and physical methods, that are classified as non-viral, were developed. These are techniques such as sonication, electroporation, liposomes or cationic polymers. Unfortunately, each of these methods has its own restrictions that severely limits their application in the treatment of humans. Scientists have high expectations for CPPs proteins, that in the future may become the main carriers of genes in *in vivo* therapies. The authors of this publication investigated the mechanism of internalization of this type of peptides, based on Tat-LK15 fusion protein. The results shed a new light on the mechanism of the transmembrane transfer of genetic material by the aforementioned protein, which most likely takes place by endocytic pathway. Non-viral gene transfer still develops rapidly and rises great hopes for the future.

Keywords: gene therapy, gene transfer, plasmids, CPPs

SAMOBÓJCZA TERAPIA GENOWA W PRÓBACH LECZENIA NOWOTWORÓW – PRZEGLĄD STRATEGII

1. Wprowadzenie

W przeciągu ostatnich kilkudziesięciu lat obserwujemy gwałtowny wzrost ilości zachorowań na nowotwory, które w niedługim czasie mogą stać się główną, pojedynczą przyczyną zgonów wśród ludności krajów wysoko rozwiniętych. Stan ten spowodowany jest wieloma czynnikami, do których możemy zaliczyć: postępujące zanieczyszczenie środowiska substancjami o charakterze kancerogennym, podwyższoną ekspozycję na promieniowanie jonizujące, emitowane przez wytwory współczesnej techniki, stale zwiększający się udział sztucznych dodatków chemicznych zawartych w żywności, złe nawyki żywieniowe, często prowadzące do otyłości i innych chorób metabolicznych, sprzyjających rozwojowi nowotworów, a także brak aktywności ruchowej. Paradoksalnie rozwój medycyny, jaki nastąpił na przestrzeni ostatnich pięćdziesięciu lat, spowodował znaczące wydłużenie średniej życia, a co za tym idzie, wywołał również wzrost zachorowalności na nowotwory, które należą, poza pewnymi wyjątkami, co do częstości występowania do chorób silnie skorelowanych z wiekiem.

Skalę problemu, z jakim musi się zmierzyć współczesna medycyna, doskonale obrazują oszacowania wykonane przez The National Cancer Institute (NCI) i The American Cancer Society (ACS), według których, w samym tylko 2012 roku, w Stanach Zjednoczonych, zostało zdiagnozowanych 1 630 910 przypadków zachorowań na różne nowotwory, z czego około 35% stanowią nowotwory źle rokujące, o średniej przeżycia poniżej roku [1]. Bardzo często są to jednostki chorobowe, w których standardowe strategie leczenia, takie jak interwencja chirurgiczna, chemio- i radioterapia, czy też połączenie powyższych metod, okazują się nieskuteczne, lub wręcz niemożliwe do zastosowania. Co więcej, każda z wymienionych strategii posiada szereg ograniczeń i skutków ubocznych, a powikłania powstałe w wyniku ich zastosowania mogą być równie groźne, co choroba, którą pierwotnie miały zwalczyć. Wystarczy wymienić tutaj nowotwory wtórne, uszkodzenia mięśnia sercowego, zmiany neurologiczne, uszkodzenia wątroby i nerek, czy też bezpłodność.

¹ m.gawronski@vp.pl, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Wydział Lekarski, Katedra i Zakład Genoterapii, Studenckie Koło Naukowe Terapii Genowej

Z tego też powodu poszukuje się nowych strategii terapeutycznych, które stanowiłyby uzupełnienie już istniejących metod, a być może w przyszłości stałyby się alternatywą obciążoną mniejszym ryzykiem wystąpienia powikłań.

Jednym z wielu podejść, które budzi nadzieję na pomyślne zastosowanie w przyszłości, jest samobójcza terapia genowa, którą postaramy się pokrótce przedstawić w niniejszej publikacji.

2. Samobójcza terapia genowa

Jak każda inna ze strategii w ramach szeroko rozumianej terapii genowej, terapia samobójcza zakłada dostarczenie do interesującej nas populacji komórek materiału genetycznego o działaniu terapeutycznym i uzyskanie w nich jak najwyższego poziomu jego ekspresji. Należy podkreślić, że w tym przypadku celem nie jest wprowadzenie i naprawa wadliwie funkcjonujących lub brakujących genów, jak to ma miejsce w suplementacyjnej terapii genowej, ani wyciszenie genów ulegających nadekspresji w komórkach nowotworowych, co jest istotą tzw. terapii supresorowej, lecz wywołanie śmierci zmienionych nowotworowo komórek za pomocą tzw. genów samobójczych.

Zwraca uwagę wyraźna przewaga samobójczej terapii genowej nad konwencjonalnymi strategiami leczenia nowotworów, jaką jest możliwość dokładnego wycelowania produktu terapeutycznego tylko i wyłącznie w populację komórek nowotworowych, dzięki czemu unika się zgubnych, ogólnoustrojowych skutków ubocznych, charakterystycznych dla chemio i radioterapii. Efekt ten uzyskuje się dzięki zastosowaniu odpowiednio zmodyfikowanych wektorów, które wykazują tropizm do komórek nowotworowych, jak również poprzez flankowanie terapeutycznego materiału genetycznego (transgenu) promotorami specyficznymi dla danego rodzaju tkanki, z której wywodzi się nowotwór, lub też specyficznymi dla warunków, jakie panują w komórce zmienionej nowotworowo.

Szczególnie ważnym zagadnieniem w terapii samobójczej, oprócz otrzymania jak najwyższej i specyficznej tkankowo ekspresji terapeutycznego materiału genetycznego, jest uzyskanie tak zwanego „efektu przechodnia” (ang. bystander effect). Jest to warunek konieczny aby terapia okazała się skuteczna, z uwagi na fakt, iż odsetek stransfekowanych komórek w środowisku nowotworu jest relatywnie niski i bardzo często ogranicza się jedynie do niewielkiego rejonu w okolicy wprowadzenia wektora, jak to ma miejsce na przykład podczas nastrzykiwania guza zawieszoną zmodyfikowanych genetycznie wirusów. Wspomniany efekt polega na tym, iż produkt powstały w wyniku ekspresji wprowadzonego insertu wydostaje się poza komórkę stransfekowaną, czy to poprzez połączenia międzykomórkowe, fagocytozę ciałek apoptotycznych przez otaczające komórki, czy chociażby poprzez wydalenie go do mikrośrodowiska nowotworu i oddziaływanie na komórki nietransfekowane, z ich następczą śmiercią. [2]

W ramach samobójczej terapii genowej stosuje się kilka podejść nastawionych na uzyskanie tego samego efektu, jakim jest śmierć komórki nowotworowej. Wypada wymienić zastosowanie układu obejmującego wprowadzenie do komórki genu samobójczego, użycie wirusów onkolitycznych, czy też wykorzystanie genów, kodujących substancje uwrażliwiające nowotwór na odpowiedź układu immunologicznego.

W dalszej części publikacji postaramy się opisać każdą z wymienionych wyżej strategii.

3. Geny samobójcze

Jednym z najstarszych elementów omawianego przez nas wariantu terapii genowej jest wykorzystanie genów samobójczych. Zazwyczaj są to sekwencje kodujące enzymy, pochodzące z innych organizmów, głównie bakterii i wirusów. Enzymy te nie posiadają swoich odpowiedników w ludzkim organizmie, lub też wykazują dużo wyższe powinowactwo do substratu, niż warianty obecne w naszym genomie. Cechą wspólną wszystkich genów samobójczych jest metabolizowanie nietoksycznych postaci leków, zwanych prolekami, do ich pochodnych o właściwym działaniu cytotoksycznym. Dzięki wprowadzeniu ich do komórki nowotworowej można uzyskać efekt cytotoksyczny ograniczony do stransfekowanej tkanki, co pozwala na eliminację zmienionych nowotworowo komórek przy jednoczesnym oszczędzeniu komórek prawidłowych. Ponadto podając bezpieczny prolek unika się ogólnoustrojowych skutków ubocznych stosowania konwencjonalnej chemioterapii.

Poniżej podjęto próbę krótkiej charakterystyki najczęściej używanych genów samobójczych terapii genowej.

3.1. Kinaza tymidynowa wirusa HSV

Jednym z najlepiej poznanych genów samobójczych, najdłużej stosowanych w różnych modelach doświadczalnych, jest gen kinazy tymidynowej (TK, Thymidine Kinase) pozyskany z wirusa opryszczki pospolitej (HSV, Herpes Simplex Virus). Komórki ssaków nie posiadają tego enzymu, możliwe jest więc ograniczenie efektu cytotoksycznego jedynie do stransfekowanych, dzielących się, komórek nowotworowych, które dzięki wprowadzeniu wspomnianego wyżej genu, uzyskują zdolność do fosforylacji analogów nukleotydów, takich jak gancyklowir (GC). Ufosforylowana forma tego leku, monofosforan gancyklowiru, podlega następnie dalszym procesom fosforylacji przez kinazy komórkowe, by finalnie przekształcić się w trójfosforan gancyklowiru, który wbudowując się w cząsteczkę DNA, w miejscu guanozyny, hamuje replikację materiału genetycznego, a w efekcie wstrzymuje podziały komórkowe.

To eleganckie i wyrafinowane rozwiązanie posiada jednak jedno, dosyć poważne ograniczenie, jakim jest wywoływanie relatywnie niewielkiego efektu przechodnia. Spowodowane jest to faktem, iż ufosforylowane analogi

nukleotydów nie przechodzą zbyt dobrze przez błonę komórkową, przez co muszą przedostawać się do innych komórek za pomocą połączeń międzykomórkowych, tzw. gap-junctions, lub też poprzez fagocytozę ciałek apoptotycznych, powstałych w wyniku śmierci pierwotnie stransfekowanej komórki, przez komórki ją otaczające.

Ponieważ w komórkach nowotworowych komunikacja na drodze połączeń międzykomórkowych jest bardzo często silnie zaburzona, proponuje się łączenie układu TK/GC z jednoczesnym wzmaganiem ekspresji genu koneksyny, odpowiedzialnej za tworzenie połączeń typu gap-junctions, głównie w drodze suplementacji kwasem retinowym [3], bromo-cAMP [4], czy też przez wcześniejsze wprowadzenie genu koneksyny 43 do interesującej nas populacji komórek[5].

Pomimo wspomnianych wyżej ograniczeń, terapia genowa z jednoczesnym wykorzystaniem genu kinazy tymidynowej i podaniem gancyklowiru uważana jest za relatywnie bezpieczną i skuteczną, co znalazło odzwierciedlenie w postaci prób klinicznych I i II fazy [6]. Trwają również prace nad poprawieniem wydajności tej strategii, głównie poprzez wzmocnienie efektu przechodnia, użycie coraz wydajniejszych wektorów, zapewniających lepszą transfekcję komórek nowotworowych, czy też łączenie tego układu z innymi genami samobójczymi.

3.2. Deaminaza cytozyny *E.coli*

5-Fluorouracyl (**5-FU**) jest lekiem, który znalazł szerokie zastosowanie w chemioterapii nowotworów złośliwych człowieka, gdyż jest inhibitorem syntezy RNA, a jego dalsze metabolity, takie jak 5-fluoro-monofosforan urydyny (**FUMP**) trwale i nieodwracalnie hamują replikację. Jednakże stosowanie 5-FU niesie za sobą szereg negatywnych skutków ubocznych, charakterystycznych dla chemioterapii.

Zastosowanie samobójczej terapii genowej z wykorzystaniem genu kodującego bakteryjny enzym – deaminazę cytozyny (**CDA**, **Cytosine Deaminase**), pozwala na obejście problemu ogólnoustrojowych skutków ubocznych stosowania 5-FU.

Dzieje się tak, ponieważ enzym ten, po wprowadzeniu do komórki nowotworowej, umożliwia syntezę wysoce toksycznego 5-FU z bezpiecznego i nietoksycznego prekursora, jakim jest 5-fluorocytozyna (**5-FC**). W efekcie, po podaniu pacjentowi 5-FC, efekt cytotoksyczny obserwuje się jedynie we wcześniej stransfekowanych komórkach nowotworowych.

Kolejną ważną zaletą tego układu jest wywoływanie bardzo silnego efektu cytotoksycznego w obrębie całego nowotworu, gdyż, inaczej niż to było w przypadku gancyklowiru, efekt przechodnia, wywołany przez 5-fluorouracyl, nie wymaga obecności połączeń między komórkami.[7]

By jeszcze bardziej wzmocnić cytotoksyczny efekt 5-FU, wektory zawierające CDA są wzbogacane o kolejny gen, mianowicie o pochodzącą z *E.coli* fosforybozylotransferazę uracylu (**UPRT**, **U**racil **P**hosphor**i**bosil **T**ransferaze), która przekształca 5-FU do FUMP, przez co nasila hamowanie syntezy DNA, a w efekcie zwiększa końcowy efekt cytotoksyczny.[8]

Podobnie jak w przypadku kinazy tyrozynowej, badania nad przydatnością terapii genowej z wykorzystaniem genu deaminazy cytozyny znajdują się obecnie w I i II fazie prób klinicznych.[6]

3.3. Fosforylaza nukleozydu purynowego *E. coli*

Podobnie jak CDA i UPRT, fosforylaza nukleozydu purynowego (**PNP**, **P**urine **N**ucleoside **P**hosphorylase) jest genem pochodzącym z bakterii *E.coli*, który, podobnie do wyżej wymienionych genów, może przekształcać nietoksyczne substraty w toksyczne produkty. W przypadku PNP jest to przemiana szerokiego spektrum nietoksycznych analogów adenozyne (jak 2-fluoro-2'-deoxyadenozyne) do toksycznych metabolitów: 2-fluoroadenyne (**F-Ade**) i 6-metylopuryny (**MeP**), które, po przekształceniach w cytozolu do toksycznych pochodnych ATP, hamują syntezę RNA i białek, wywołując istotny efekt cytotoksyczny zarówno w komórkach proliferujących, jak i dzielących się. Co więcej, dzięki możliwości przechodzenia przez błony komórkowe, F-Ade i MeP są zdolne do wywołania bardzo silnego i rozległego efektu cytotoksycznego [9].

Skuteczność terapii genowej z wykorzystaniem genu PNP pochodzącego z *E.coli* została dowiedziona na mysim modelu glejaka, co budzi spore nadzieje na wykorzystanie tej metody w leczeniu nowotworów u człowieka [10].

3.4. Karboksypeptydaza G2

Omówione wyżej strategie opierały się zasadniczo na wytworzeniu cytotoksycznych analogów nukleotydów, które po wbudowaniu się do materiału genetycznego w procesie replikacji DNA wywoływały jego uszkodzenia, prowadząc tym samym do zatrzymania cyklu komórkowego i śmierci komórki. Podejście to jest jednak skuteczne jedynie w przypadku komórek proliferujących (skądinąd takimi są z reguły komórki nowotworowe), dlatego też poszukuje się genów samobójczych, które zdolne są do wywoływania efektu cytotoksycznego również w komórkach dzielących się.

Odpowiedzią na to zapotrzebowanie jest samobójcza terapia genowa z wykorzystaniem genu karboksypeptydazy G2, izolowanej z bakterii *Pseudomonas*. Jest to wysoce efektywny enzym, który przekształca proleki będące zmodyfikowanymi iperytami azotowymi, takie jak CMDA i ZD2767P do silnie toksycznych form, tworzących wiązania krzyżowe w materiale genetycznym stransfekowanej komórki.

Największą zaletą tego genu samobójczego jest fakt, iż nie ma on swojego odpowiednika w genomach ssaków, dzięki czemu zyskuje się pewność, iż działanie wysoce toksycznych produktów ogranicza się jedynie do transfekowanej populacji komórek nowotworowych.

Obecnie trwają prace nad zwiększeniem cytotoksycznego efektu przechodnia w terapii z użyciem karboksypeptydazy G2, poprzez modyfikację jej genu w taki sposób, by enzym ten zakotwiczał się w błonie komórkowej. Umożliwia to katalizę hydrofilowego leku, obecnego na zewnątrz komórki, do postaci hydrofobowej, łatwo penetrującej przez błonę komórkową. W efekcie uzyskuje się znaczne nasilenie efektu przechodnia [11].

Z racji swych unikalnych właściwości, budzących znaczne nadzieje na skuteczne zastosowanie tego systemu w przyszłych technikach leczenia nowotworów, terapia samobójcza z wykorzystaniem genu karboksypeptydazy G2 znalazła się obecnie w II fazie badań klinicznych [6]

3.5. CYP2B1

Jedną z ciekawszych strategii w ramach samobójczej terapii genowej jest wykorzystanie ludzkiego genu cytochromu P450 2B1, odpowiadającego za bioaktywację cyklofosfamidu – leku alkilującego, którego metabolity wprowadzają wiązania krzyżowe do DNA chromosomów.

Wydawałoby się, iż wprowadzanie dodatkowej kopii genu do komórek, w których jest on już obecny, jest bezzasadne. Należy jednak pamiętać, iż aktywność tego genu ogranicza się głównie do wątroby, która odpowiada za procesy detoksykacji, a metabolity cyklofosfamidu w niewielkim tylko stopniu przechodzą przez barierę krew-mózg. Zastosowanie tego typu strategii wydaje się być uzasadnione np. w leczeniu glejaków, a także nowotworów wywodzących się z innych tkanek, w których brak jest aktywności tego cytochromu, lub też jest ona zbyt niska, by ewentualne leczenie cyklofosfamidem było efektywne.

Eksperymentalna terapia przeprowadzona w mysim modelu glejaka wykazała skuteczność tego podejścia w uwrażliwianiu komórek nowotworowych na działanie cyklofosfamidu i prowadziła do częściowej regresji nowotworu.[12]

3.6. Toksyny bakteryjne

Toksyny bakteryjne, pomimo że nie wpisują się w klasyczną definicję genu samobójczego, zostały zaadoptowane na potrzeby samobójczej terapii genowej. Poprzez wykorzystanie odpowiednio zmodyfikowanych wektorów, głównie wirusowych, możliwe jest wprowadzenie do komórki nowotworowej genów kodujących wspomniane wyżej toksyny pod nowotworowo-specyficznym promotorem, dzięki czemu efekt cytotoksyczny wywołany obecnością bakteryjnych toksyn w komórce ogranicza się do interesującej nas tkanki. Głównym atutem stosowania terapii z wykorzystaniem toksyn bakteryjnych jest

możliwość uderzenia zarówno w populację komórek proliferujących, jak i niedzielących się. Poniżej przedstawiamy kilka przykładów tego typu strategii.

3.6.1. Streptolizyna O z *Streptococcus pyogenes*

Jest to toksyna wydzielana przez bakterie z rodzaju *Streptococcus*, która łącząc się z cząsteczkami cholesterolu, obecnymi w błonie komórkowej, tworzy pierścieniowe struktury, złożone z 45-50 jednostek, o średnicy 25-30nm. Dzięki tej własności streptolizyna O znalazła zastosowanie w wielu systemach dostarczania różnego rodzaju substancji, w tym DNA i RNA, do komórek ludzkiego organizmu. Jednakże przedłużająca się obecność streptolizyny O w błonie komórkowej skutkuje poważnymi zaburzeniami w równowadze osmotycznej i elektrolitycznej komórki, prowadząc do jej śmierci w mechanizmie nekrozy. Badania prowadzone w mysim modelu raka szyjki macicy wykazały, że transfekcja nowotworu wektorem adenowirusowym, kodującym wspomniany wyżej gen, wywołała redukcję rozmiarów guzów litych o średnio 29,3%, wskazując tym samym na potencjalną skuteczność przedstawionej metody [13]

3.6.2. Egzotoksyna A z *Pseudomonas aeruginosa*

Egzotoksyna A jest jednym z czynników wirulencji pałeczki ropy błękitnej, Zaburza on syntezę białek komórkowych, w krótkim czasie prowadząc do śmierci komórki. Toksynę tą zaadoptowano na potrzeby terapii genowej glejaka. Komórki tego nowotworu wykazują wybitną ekspresję specyficznego dla glejaka wariantu receptora dla IL-13 (IL13R α 2), dlatego też sprzęgnięto zmutowaną formę IL-13 ze wspomnianą wyżej toksyną i konstrukt ten dostarczono do komórek nowotworowych w wektorze adenowirusowym, zapewniającym stałą ekspresję leczniczego transgenu. Uzyskano w ten sposób wysoce specyficzny układ, w którym dochodziło tylko i wyłącznie do eliminacji komórek nowotworowych [14]. Powyższa strategia terapeutyczna okazała się na tyle skuteczna, iż dotarła do III fazy badań klinicznych, jednakże nie udało się osiągnąć założonych punktów końcowych. Obecnie trwają prace nad ulepszeniem opisanej terapii [6].

4. Wirusy onkolityczne

Inne ważne podejście samobójczej terapii genowej polega na wykorzystaniu wirusów onkolitycznych. W tym przypadku narzędziem jest cały wirus, zwykle defektywny w porównaniu ze swoją formą wyjściową, zdolny do infekowania tylko zmienionych nowotworowo komórek, namnażania się w nich i wywołania ich śmierci na drodze lizy. Wspomniana wyżej swoistość, zdolność do replikacji w komórkach nowotworowych i ich lizy (mechanizmy omówiono niżej dla każdego z tych wirusów z osobna) jest najczęściej wspomagana sztucznie serią

modyfikacji genetycznych, mających na celu np. poprawę zdolności wektorów wirusowych do rozpoznawania epitopów powierzchniowych komórek nowotworowych, takich jak wspomniany wcześniej receptor dla IL-13 na komórkach glejaka lub inne receptory czynników wzrostowych, bardzo często podlegające nadekspresji na komórkach nowotworowych. Inny typ modyfikacji polega na podłączeniu genów istotnych dla replikacji wirusa pod promotory specyficzne dla danego typu nowotworów.

Co więcej, wspomniana możliwość replikacji odpowiada za bardzo szybkie rozprzestrzenianie się tych wirusów w obrębie całego nowotworu, co daje temu podejściu przewagę nad strategiami z wykorzystaniem innych wektorów.

Częstym, pozytywnym skutkiem ubocznym terapii z zastosowaniem wirusów onkolitycznych jest wzbudzenie odpowiedzi ze strony układu immunologicznego. Komórki nowotworowe cechuje zwykle niska immunogenność, jednak po transfekcji wektorem wirusowym zaczynają one bardzo często eksponować na powierzchni fragmenty peptydów wirusowych w restrikcji w zakresie cząsteczek MHC klasy I. Konsekwencją bywa rozpoznawanie komórek nowotworowych i zabijanie ich w drodze apoptozy przez limfocyty cytotoksyczne [15]

Ze względu na wyżej wymienione właściwości, terapia genowa z wykorzystaniem wirusów onkolitycznych cieszy się coraz większym zainteresowaniem. Poniżej przedstawiono kilka przykładów zastosowania tych wirusów w próbach leczenia nowotworów.

4.1. Herpes Simplex Virus (HSV-1)

Wirus opryszczki jest jednym z najszerzej stosowanych wirusów onkolitycznych, namnaża się zarówno w komórkach nieproliferujących, jak i dzielących się, chociaż posiada stosunkowo duży genom, jest relatywnie bezpieczny i łatwy w modyfikowaniu. Pozbawiony genu kinazy tymidynowej, replikuje wyłącznie w komórkach z aktywnym szlakiem sygnałowym EGFR/Ras, a właśnie wybitna aktywność tego szlaku ma miejsce w wielu nowotworach. Inne modyfikacje polegają na zastosowaniu promotora nestyny, który ulega nadekspresji w komórkach glejaka, a także użycie innych promotorów specyficznych tkankowo. Dzięki łatwości dokonywania kolejnych modyfikacji genetycznych, wiele onkolitycznych mutantów tego wirusa weszło do I i II fazy badań klinicznych [15, 16, 6]

4.2. ONYX-015 i Ad5Delta24

Są to dwa najlepiej zbadane wirusy onkolityczne, należące do grupy warunkowo replikujących się adenowirusów (**C**onditionally-**R**eplicating **A**denovirus, **CRAd**), które mają zdolność do replikacji jedynie w komórkach z zaburzeniami ważnych szlaków sygnałowych. Właściwość tę uzyskuje się poprzez usunięcie genów wirusowych odpowiedzialnych za dezaktywację

mechanizmów obronnych zdrowych komórek gospodarza. Na przykład, wirus może namnożyć się tylko w komórkach z brakującymi genami supresorowymi cyklu. W komórkach zdrowych geny te przeciwdziałają nowotworzeniu, więc często są celem dezaktywujących mutacji w przebiegu onkogenezy. Skoro nie ma ich w komórkach nowotworowych, ubocznym efektem jest wrażliwość tych ostatnich (i tylko ich) na działanie zmodyfikowanego wirusa [15]

4.2.1. ONYX-015

ONYX-015 został pozbawiony genu kodującego białko E1B, które wiąże się z białkiem p53, uniemożliwiając zahamowanie cyklu komórkowego, a w efekcie promując proliferację komórki. Pozbawienie tego genu sprawia, iż wirus ten może namnażać się jedynie w komórkach z nieaktywnym białkiem p53, a do takich właśnie należy większość komórek nowotworowych. Wykazano skuteczność terapii z wykorzystaniem tego wirusa w II fazie badań klinicznych w przypadku nowotworów głowy i szyi. Jego użycie doprowadziło w 10% przypadków do całkowitej regresji, zaś w 62% przypadków zahamowało czasowo rozwój choroby. Zaobserwowano także spadek odsetka chorych z progresją nowotworu. Udało się ponadto dowieść, że postępowanie to było bezpieczne [17]. W innych badaniach wykazano synergistyczny efekt takiej terapii po połączeniu jej z radioterapią, mierzony stopniem redukcji objętości guza [18].

4.2.2. Ad5Delta24

W przypadku wirusa onkolitycznego Ad5Delta24 usunięty został gen E1A, hamujący aktywność genu supresorowego Rb. Wirus replikuje się więc jedynie w komórkach pozbawionych tego genu. Zaburzenia funkcjonowania genu Rb są bardzo częste w wielu typach nowotworów, jednak szczególne nadzieje wiąże się z możliwością zastosowania tego wirusa w leczeniu glejaków. W badaniach *in vivo* wykazano wysoką skuteczność Ad5Delta24 w hamowaniu wzrostu tego nowotworu [19]. Obecnie prowadzone są badania kliniczne I fazy [6].

5. Modulacja odpowiedzi immunologicznej

I wreszcie do strategii samobójczych w ramach szeroko rozumianej terapii genowej, zalicza się niekiedy transfekowanie komórek nowotworu genami kodującymi białka, które pobudzają miejscową odpowiedź immunologiczną, skierowaną przeciw tkance nowotworowej. Najczęściej stosowanym narzędziem jest dostarczenie do komórek guza genów kodujących różnego rodzaju cytokiny, które poprzez bardzo szeroką sieć interakcji mają zdolność ponownego włączenia komórek nowotworowych pod nadzór systemu immunologicznego. Jest to szczególnie ważne w przypadku nowotworów o bardzo niskiej immunogenności.

W niniejszym zwięzłym przeglądzie stosowanych metod, nakierowanym głównie na użycie typowych genów samobójczych oraz wirusów onkologicznych, a nie na techniki *de facto* z zakresu immunoterapii genowej, problem zasygnalizowano wyłącznie skrótowo. *Nota bene*, na przestrzeni wielu lat, do walki z nowotworami została zaprzęgnięta praktycznie każda cytokina, wywołująca lokalną rekrutację lub aktywację komórek układu immunologicznego do mikrośrodowiska guza, zwiększająca ekspresję antygenów powierzchniowych klasy MHC I i II, czy też uwrażliwiająca komórki nowotworowe na indukcję apoptozy.

Najczęściej stosowanymi cytokinami, z którymi wiąże się wciąż duże nadzieje terapeutyczne są: Interferony: β i γ , $TNF\alpha$, Ligand Fas, TRAIL, IL-2 i IL-12 [2]

Strategie obejmujące wprowadzanie wektorów zawierających wspomniane wyżej cytokiny w połączeniu ze standardowymi metodami leczenia nowotworów, trafiły w kilku przypadkach do badań klinicznych (fazy I-III) [6].

6. Podsumowanie

Samobójcza terapia genowa to szeroki zbiór precyzyjnych i wyrafinowanych metod terapeutycznych, charakteryzujących się stosunkowo wysokim bezpieczeństwem stosowania i ogromnymi możliwościami modyfikacji poszczególnych technik w taki sposób, by jak najlepiej służyły walce z danym typem złośliwego nowotworu. Wysoka swoistość poszczególnych strategii, ograniczająca pojawienie się poważnych, ogólnoustrojowych skutków ubocznych, czy też możliwość wywołania efektu terapeutycznego w stosunku do nowotworów niepoddających się standardowemu leczeniu i źle rokujących, sprawia, iż ten rodzaj terapii genowej budzi coraz większe nadzieje i w przyszłości może stać się istotnym uzupełnieniem obecnie stosowanych metod. Aby jednak tak się stało, konieczne są intensywne badania, mające na celu poprawę skuteczności transfekcji komórek nowotworowych, zarówno poprzez tworzenie nowych nośników genów terapeutycznych, jak i dalsze modyfikacje już istniejących wektorów. Konieczne jest także opracowanie skuteczniejszych sposobów wywoływania odpowiednio nasilonego efektu przechodnia, stanowiącego nieodzowny warunek powodzenia tego typu strategii leczniczych.

Literatura

- [1] American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2012*. [online] 2012 [dostęp 10 luty 2014]. Dostępny w World Wide Web: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>
- [2] Barańska M., Skrętkowicz J. *Perspektywy terapii genowej*, Wiadomości lekarskie, 2007 vol 7-8, s. 305-317

- [3] Park J.Y., Elshami A.A., Amin K., Rizk N., Kaiser L.R., Albelda S.M. *Retinoids augment the bystander effect in vitro and in vivo in herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-mediated gene therapy*, Gene Therapy, 1997 vol. 4, nr 9, s.909-917
- [4] Kunishige I., Samejima Y., Moriyama A., *cAMP stimulates the bystander effect in suicide gene therapy of human choriocarcinoma* Anticancer Research, 1998 vol.18, s. 3411-3419
- [5] Dufлот-Dancer A., Piccoli C., Rolland A., Yamasaki H., Mesnil M., *Long-term connexin-mediated bystander effect in highly tumorigenic human cells in vivo in herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy*, Gene Therapy, 1998 vol. 5, s. 1372-1378
- [6] Journal of Gene Medicine Gene Therapy Clinical Trials Worldwide.[online] 2014 [dostęp 10 luty 2014]. Dostępny w World Wide Web: <http://www.abedia.com/wiley/index.html>
- [7] Johnson A.J., Ardiani A., Sanchez-Bonilla M., Black M.E., *Comparative Analysis of Enzyme and Pathway Engineering Strategies for 5FC-Mediated Suicide Gene Therapy Applications*, Cancer Gene Therapy, 2011 vol. 18, nr 8, s. 533-542
- [8] Christensen C.L, Gjetting T., Poulsen T.T, Cramer F., Roth J.A., Poulsen H.S. *Targeted cytosine deaminase-uracil phosphoribosyl transferase suicide gene therapy induces small cell lung cancer specific cytotoxicity and tumor growth delay*, Clinical Cancer Research, 2010 vol. 16, nr 8, s. 2308-2319
- [9] Tai C.K., Wang W., Lai Y.H., Logg C.R., Parker W.B., Li Y.F., Hong J.S., Sorscher E.J., Chen T.C., Kasahara N. *Enhanced efficiency of prodrug activation therapy by tumor-selective replicating retrovirus vectors armed with the escherichia coli purine nucleoside phosphorylase gene*. Cancer Gene Therapy. 2010 vol. 17, s. 614-623
- [10] Bharara S., Sorscher E.J., Gillespie G.Y., Lindsey J.R., Hong J.S., Curlee K.V., Allan P.W., Gadi V.K., Alexander S.A., Secrist J.A, Parker W.B., Waud W.R. *Antibiotic-Mediated Chemoprotection Enhances Adaptation of E. coli PNP for Herpes Simplex Virus-Based Glioma Therapy*, Human Gene Therapy, 2005 vol. 16, nr 3, s. 339-347
- [11] Cowen R.L, Williams J.C, Emery S., Blakey D., Darling J.L., Lowenstein P.R., Castro M.G. *Adenovirus vector-mediated delivery of the prodrug-converting enzyme carboxypeptidase G2 in a secreted or GPI-anchored form: High-level expression of this active conditional cytotoxic enzyme at the plasma membrane*, Cancer Gene Therapy, 2002 vol. 9, nr 11, s. 897-907
- [12] Wei M.X., Tamiya T., Chase M., Boviatsis E.J., Chang T.K., Kowall N.W., Hochberg F.H., Waxman D.J., Breakefield X.O., Chiocca E.A. *Experimental tumor therapy in mice using the cyclophosphamide-activating cytochrome P450 2B1 gene*, Human Gene Therapy, 1994 vol.5, nr 8, s. 969-78
- [13] Yang W.S., Park S., Yoon A., Yoo J.Y., Kim M.K., Yun Ch., Kim Ch. *Suicide cancer gene therapy using pore-forming toxin, streptolysin O*, Molecular Cancer therapeutics, 2006 vol. 5, nr 6, s. 1610-1619
- [14] Candolfi M., Xiong W., Yagiz K., Liu Ch., Muhammad A.K.M.G., Puntela M., Foulad D., Zadmehr A., Ahlzadeh G.E., Kroeger K.M., Tesarfreund M., Lee S., Debinski W., Sareen D., Svendsen C.N., Rodriguez R., Lowenstein P.R., Castro M.G. *Gene therapy-mediated delivery of targeted cytotoxins for glioma therapeutics*, PNAS 2010 vol. 107, nr 46, s. 20021-20026

- [15] Justyna Augustyniak J., Sawicki K., Skrzypczak M., Kapka-Skrzypczak L. *Zastosowanie wirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej*, Problemy Higieny i Epidemiologii, 2012 vol. 93, nr 4, s. 654-662
- [16] Kambara H., Okano H., Chiocca E.A., Saeki Y. *An Oncolytic HSV-1 Mutant Expressing ICP34.5 under Control of a Nestin Promoter Increases Survival of Animals even when Symptomatic from a Brain Tumor*, Cancer Research, 2005 vol. 65, nr 7, s. 2832-2839
- [17] Nemunaitis J., Khuri F., Ganly I., Arseneau J., Posner M., Vokes E., Kuhn J., McCarty T., Landers S., Blackburn A., Romel L., Randlev B., Kaye S., Kirn D. *Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer* Journal of Clinical Oncology, 2001 vol. 19, nr 2, s. 289-298
- [18] Kenneth R. Rogulski K.R., Freytag S.O., Zhang K., Gilbert J.D., Paielli D.L., Kim J.H., Heise C.C., Kirn D.H. *In Vivo Antitumor Activity of ONYX-015 Is Influenced by p53 Status and Is Augmented by Radiotherapy*, Cancer Research, 2000 vol. 60, s. 1193-1196
- [19] Juan Fueyo J., Gomez-Manzano C., Alemany R., Lee P.S.Y., McDonnell T.J., Mitlianga P., Shi Y., Levin V.A., Yung A.W.K., Kyritsis A.P. *A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo*, Oncogene, 2000 vol 19, nr 1, s. 2-12

Samobójcza terapia genowa w próbach leczenia nowotworów – przegląd strategii

Streszczenie:

Od kilkudziesięciu lat obserwujemy systematyczny wzrost zachorowań na nowotwory, a ich leczenie stanowi jedno z największych wyzwań współczesnej medycyny. Standardowe strategie walki z nowotworami, takie jak chemioterapia, leczenie chirurgiczne, radioterapia, czy też połączenie wyżej wymienionych, posiadają szereg wad i wywołują liczne skutki uboczne, które wpływają na jakość życia pacjentów. Co więcej, spora część nowotworów kiepsko odpowiada na standardowe leczenie, lub nie poddaje mu się wcale. Z tego powodu poszukuje się terapii, które mogłyby być alternatywą lub wzmocnieniem dla obecnie stosowanych metod. Jednym z takich podejść, które budzi ogromne nadzieje na przyszłość jest samobójcza terapia genowa, dzięki której możliwe jest wysoce selektywne niszczenie komórek nowotworowych, przy jednoczesnym uniknięciu ogólnoustrojowych skutków ubocznych. Jest to możliwe dzięki wprowadzeniu do komórek nowotworowych terapeutycznego materiału genetycznego, najczęściej w postaci genów samobójczych, genów kodujących toksyny bakteryjne, czy też cytokiny za pomocą wysoce specyficznych wektorów, wykazujących tropizm do komórek nowotworu. Terapia samobójcza zakłada także wykorzystanie wirusów onkolitycznych, które mają zdolność do replikacji w zmienionych nowotworowo komórkach i wywoływania ich lizy. Niniejsza publikacja stanowi krótką charakterystykę najczęściej stosowanych strategii terapeutycznych w ramach szeroko rozumianej samobójczej terapii genowej nowotworów.

Słowa kluczowe: terapia genowa, geny samobójcze, wirusy onkolityczne, nowotwory

Siucide gene therapy as an attempt to cancer treatment – a review of strategies

Abstract:

Over the last decade we have seen dramatic increase in incidence of many cancer types and their treatment is one of the greatest challenges of modern medicine. Standard strategies used in cancer treatment, such as chemotherapy, surgery, radiotherapy, or a combination of the aforesaid, have a number of disadvantages and cause many side effects, which affect the quality of patients' life. Moreover, a large number of cancers responds poorly to standard therapy, or is resistant to them. For this reason, researchers are looking for therapies, which could be an alternative to the currently used methods. One of such approaches that raises great hopes for the future is suicide gene therapy, which could be very selective in killing cancer cells while sparing normal ones and avoiding systemic side effects. These properties are obtained by delivering therapeutic genetic material, such as suicide genes, genes that encode bacterial toxins or cytokines to cancer cells by using highly specific vectors. Using oncolytic viruses is also very popular approach in suicide gene therapy because of their ability to replicate only in malignant cells and therefore induce their lysis. This publication provides a brief description of the most commonly used therapeutic strategies in the context of suicide gene therapy of cancers.

Keywords: gene therapy, suicide genes, oncolytic viruses, cancer

Sylwia Katarzyna Król¹, Dorota Choroszyńska², Arkadiusz Macheta³ Magdalena Osiak⁴, Natalia Pająk⁵

SUBSTYTUTY SKÓRY ORAZ INŻYNIERIA TKANKOWA W REGENERACJI UBYTKÓW SKÓRY

1. Wstęp

Pierwsze próby leczenia oparzeń oraz zamykania ran z wykorzystaniem skóry jako opatrunku podjęto na początku XIX wieku. Początkowo miały one charakter jedynie eksperymentalny i kończyły się niepowodzeniem. Badania te skłoniły jednak badaczy do dalszego poszukiwania lepszych i bardziej skutecznych metod zamykania ran pourazowych, oparzeniowych i troficzných.

Ponad 200 lat temu, w 1803 roku po raz pierwszy Baronio przeprowadził pionierskie badania na owcy, w oparciu o które stwierdził, że skóra może być przeszczepiona z jednego miejsca ciała na inne [1]. Następnie, w roku 1869 szwajcarski lekarz Jacques-Louis Reverdin przeprowadził pierwszy auto-przeszczep naskórka u człowieka [2]. Dwa lata później, w 1871 roku Pollock dokonał pierwszego alloprzeszczepu kawałków swojej skóry [3]. Krok w przód nastąpił w 1881, kiedy to Girdner opatrzył dużą ranę oparzeniową, skórą pobraną od zwłok [4].

Moment przełomowy nastąpił jednak w 1975 roku, kiedy z powodzeniem Rheinwald i Green wyhodowali ludzkie keratynocyty i otrzymali wielo-warstwowy płat naskórka [3]. Metoda ta prowadzona była z wykorzystaniem fibroblastów 3T3 i umożliwiała otrzymanie z 1 cm² wycinka skóry, komórek zajmujących obszar porównywalny z powierzchnią ciała dorosłego człowieka [5]. W latach 1981 i 1984 O'Conner i Gallico jako pierwsi wykorzystali wyhodowany, autogeny naskórek do leczenia oparzeń III stopnia i przeszczepili je pacjentom [6].

Obecnie dostępnych jest wiele substytutów skóry, jednak każdy z nich posiada pewne ograniczenia. Dlatego też głównym zadaniem naukowców w medycynie regeneracyjnej jest możliwość opracowania jak najbardziej „idealnego” zamiennika skóry. Niestety głównym utrudnieniem są niewątpliwie wysokie koszty związane z ich produkcją.

¹ sylwia_krol15@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej

² dorota.ch.um@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej

³ arek.macheta@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Katedra i Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku

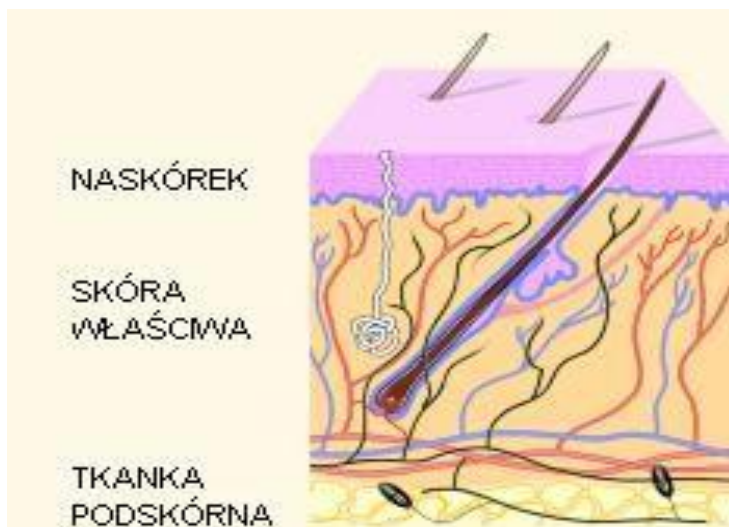
⁴ magdalenaosia@op.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej

⁵ natalia.pajak@op.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej

2. Budowa i funkcje skóry

Skóra jest największym narządem ludzkiego ciała. Stanowi 1/10 ogólnej masy ciała i pokrywa powierzchnię około 1,5-2 m² [7]. Zbudowana jest z dwóch głównych warstw: wielowarstwowego naskórka (łac. epidermis) i skóry właściwej (łac. dermis) [8], opartych na warstwie tłuszczu, zwanej tkanką podskórną (łac. hypodermis; subcutis). Tkanka podskórna odpowiada za połączenie skóry ze strukturami niżej leżącymi, takimi jak np. kość czy mięśnie. Zbudowana jest z luźnej tkanki łącznej, która w swej strukturze zawiera tkankę tłuszczową o różnej grubości.

Naskórek stanowi granicę pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a ludzkim ciałem. Zbudowany jest z kilku rodzajów komórek, spośród których aż 90-95% stanowią keratynocyty. Skóra właściwa od naskórka oddzielona jest błoną podstawną [7, 9]. Głównym składnikiem, tworzącym skórę właściwą są fibroblasty, które są odpowiedzialne za syntezę m.in. kolagenu i elastyny, fibronektyny, proteoglikanów i glikozoaminoglikanów – włókien podporowych zapewniających elastyczność skórze [7, 9, 10]. Uproszczony schemat budowy skóry przedstawia rys. 1. [11].



Rys. 1. Uproszczony schemat budowy skóry [11 – zmodyfikowano]

Skóra pełni wiele ważnych funkcji [7, 9, 12]. Stanowi anatomiczną i fizjologiczną barierę, która zabezpiecza organizm przed środowiskiem zewnętrznym oraz utratą płynów fizjologicznych, utrzymując jednocześnie wewnętrzną homeostazę, poprzez regulację gospodarki wodnej i elektrolitowej organizmu. Dzięki swojej wytrzymałości, elastyczności i półprzepuszczalności

chroni ciało przed urazami mechanicznymi i termicznymi oraz stanowi zapórę dla czynników zewnętrznych, takich jak patogeny czy szkodliwe promieniowanie [12].

Skóra pełni również funkcję narządu wydzielniczego, ze względu na obecność w niej gruczołów potowych i łojowych. Dzięki obecności licznych, wyspecjalizowanych zakończeń nerwowych, skóra uczestniczy w procesie percepcji i odczuwaniu dotyku, bólu, temperatury oraz w procesach odpornościowych organizmu [8, 9, 12]. Układ odpornościowy skóry stanowią rozmaite komórki zlokalizowane w naskórku i skórze właściwej, określane mianem tkanki limfatycznej związanej ze skórą (ang. *skin associated lymphoid tissue* – SALT) lub układem odpornościowym skóry (ang. *skin immune system* – SIS). SIS stanowią między innymi: komórki dendrytyczne, keratynocyty, makrofagi, granulocyty, limfocyty T, komórki tuczne, melanocyty, a także komórki śródbłonna naczyniowego. Komórki dendrytyczne, a zwłaszcza komórki Langerhansa oraz keratynocyty są jednymi z najważniejszych komórek SIS. Dzięki obecności długich wypustek, komórki Langerhansa uczestniczą w wychwytywaniu czynników zakaźnych oraz wszelkich substancji, które przenikają w głąb skóry.

W stymulacji układu immunologicznego skóry czynnie uczestniczą również keratynocyty, które stanowią około 95% masy komórkowej naskórka. Są one ściśle powiązane z układem immunologicznym skóry, dzięki wytwarzaniu czynników wzrostu i cytokin. Przez wydzielane cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu ściśle współpracują z komórkami Langerhansa i innymi komórkami SIS [13].

3. Inżynieria tkankowa w regeneracji ubytków skóry

Inżynieria tkankowa to interdyscyplinarna dziedzina, która wykorzystuje różne zasady i metody na rzecz rozwoju biologicznych substytutów, które przywracają, utrzymują lub poprawiają funkcję tkanek lub całego organizmu [14].

Dotychczasowe osiągnięcia inżynierii tkankowej są przełomem w leczeniu rozległych ubytków skórnych. Dzięki zastosowaniu metod inżynierii tkankowej możliwe jest odtworzenie nowej tkanki, która jest taka sama pod względem funkcjonalnym i strukturalnym jak zdrowa tkanka [15]. Dziedzina ta jest obecnie najbardziej rozwiniętą dziedziną medycyny regeneracyjnej. Daje nadzieję na regenerację tkanek oraz umożliwia zastąpienie tkanki uszkodzonej nową tkanką, wyprodukowaną w warunkach laboratoryjnych. Głównym celem użycia wyhodowanych komórek skóry jest szybkie ich wykorzystanie oraz przywrócenie skórze dotychczasowej funkcji. Tkanka ta powinna stanowić skuteczną barierę, która chroni organizm przed utratą wody oraz różnego rodzaju infekcjami [16].

Regeneracja rozległych ubytków skórnych, a w szczególności urazów oparzeniowych, stanowi poważny problem. Tkanki uszkodzone w wyniku

oparzenia lub urazu najczęściej leczy się chirurgicznie, farmakologicznie lub poprzez transplantację organów. Niestety przeszczep narządów związany jest z koniecznością przyjmowania leków immunosupresyjnych. Komórki pobrane do rekonstrukcji i regeneracji uszkodzonej tkanki mogą być autologiczne (dawca i biorca jest ten sam organizm), allogeniczne (dawca i biorca należą do tego samego gatunku) oraz ksenogeniczne (dawca i biorca należą do różnych gatunków) [17]. W przypadku przeszczepienia komórek w warunkach laboratoryjnych, ogromną zaletą jest brak konieczności przyjmowania leków immunosupresyjnych, ponieważ przeszczepiona tkanka pochodzi najczęściej z wyhodowanych komórek autologicznych biorcy [18]. Zaletą metody autowogenicznej jest również brak odpowiedzi układu immunologicznego. Jednak pomimo wielu zalet, metoda ta ma pewne ograniczenia. Niestety, długi czas oczekiwania na wyhodowanie tkanki *in vitro*, niesie ze sobą pewne ryzyko, ponieważ pacjent podatny jest na wszelkiego rodzaju infekcje, a uszkodzona tkanka może ulegać obkurczeniu i bliznowaceniu. Mimo że, przeszczepy autologiczne stanowią obecnie normę w regeneracji ubytków skóry, metoda ta nie nadaje się do regeneracji rozległych ran. Wadą metody jest również to, że w miejscu pobrania pozostaje ubytek skóry [15]. Przeszczep allogeniczny czy ksenogeniczny, w odróżnieniu do przeszczepu autologicznego zawsze jest obciążony ryzykiem odrzucenia i wiąże się z koniecznością przyjmowania przez pacjenta leków immunosupresyjnych. Dlatego też, ogromną nadzieję pokłada się w substytutach skóry, które są obecnie przedmiotem intensywnych badań.

Możliwość łączenia komórek uzyskanych w hodowli *in vitro* z biodegradowalnymi matrycami przestrzennymi, które pełnią funkcję rusztowania dla uzyskanych komórek, stanowi jeden z najważniejszych kierunków inżynierii tkankowej w regeneracji ubytków skóry [19]. Nowe tkanki uzyskuje się poprzez namnożenie komórek i połączenie ich z matrycami naturalnymi lub syntetycznymi. Tkanki te zostają umieszczone w bioreaktorach, gdzie wszystkie procesy biologiczne i biochemiczne podlegają stałej i ścisłej kontroli. Matryca wraz z komórkami zostaje przeszczepiona do uszkodzonego miejsca, gdzie komórki namnażają się i grupują, tworząc nową tkankę. Następnie polimer ulega stopniowej degradacji, dzięki czemu uzyskuje się produkt w postaci nowego narządu, podobnego do naturalnego [20, 21].

4. Substytuty skóry

Substytuty skóry stanowią heterogenną grupę materiałów, które są wykorzystywane w zamknięciu rany i przejmują czasowo lub na stałe funkcję skóry [22]. Mogą one zastąpić skórę właściwą i służyć jako warstwa powierzchniowa, na której można by było wyhodować keratynocyty – komórki tworzące naskórek.

W zależności od swej budowy Kumar i wsp. [23] dokonali podziału materiałów zastępczych skóry na trzy klasy:

- klasa I – jedno- lub dwuwarstwowe czasowe materiały opatrunkowe,
- klasa II – jednowarstwowe substytuty skóry (epidermalne lub dermalne),
- klasa III – złożone substytuty skóry.

Jednak, z praktycznego punktu widzenia, substytuty skóry można sklasyfikować w dwie główne grupy: substytuty trwałe i tymczasowe oraz substytuty syntetyczne i biologiczne [12, 24, 25]. Zasadniczą rolą tymczasowych substytutów skóry jest fizjologiczne zamknięcie rany, ochrona przed wtórnymi urazami mechanicznymi i kolonizacją bakterii oraz zapewnienie wilgotnego środowiska rany [24, 25]. Tymczasowe substytuty skóry mogą być wykorzystywane w praktyce klinicznej do pokrywania ran powierzchniowych, do momentu uzyskania wtórnej epitelizacji oraz w leczeniu głębokich ran przed planowanym przeszczepem. Dodatkowo, substytuty te mogą być stosowane do ochrony miejsc, z których pobrano skórę do przeszczepu. Ma to na celu pobudzenie procesu naskórkowania oraz zmniejszenie dolegliwości bólowych [25].

Stałe substytuty skóry wykorzystywane są w ostatecznym uzupełnieniu ubytków powłok ciała. Biologiczne substytuty skóry w stosunku do sztucznych substytutów skóry nie są drogie. Najczęściej wykorzystywane biologiczne substytuty skóry stanowią materiały pochodzące od tego samego gatunku – allografy lub od osobników innego gatunku. W przypadku allografów, mogą być one pobierane od zwłok [25]. Atutem substytutów biologicznych jest względnie nienaruszona struktura macierzy pozakomórkowej [25, 26]. Natomiast, zaletą wykorzystania sztucznych ekwiwalentów skóry jest możliwość modyfikacji ich właściwości, między innymi poprzez uzupełnianie o elementy macierzy pozakomórkowej, czy czynniki wzrostu. Niepodważalną ich wadą jest niestety brak błony podstawnej oraz obecność struktury przestrzennej, która nie jest podobna do naturalnej skóry [26].

Naukowcy z całego świata, lekarze, a zwłaszcza pacjenci pokładają nadzieję w możliwość stworzenia najbardziej optymalnego substytutu skóry. Takie „idealne zamienniki” skóry powinny przede wszystkim umożliwić natychmiastowe uzupełnienie ubytku skóry [22]. Ponadto, powinny się one charakteryzować następującymi cechami [24]:

- Stanowiąc barierę chroniącą przed infekcjami,
- Zapobiegać utracie wody,
- Powinny być łatwe w użyciu jako opatrunki,
- Powinny spełniać kryteria sterylności,
- Zapewniać odpowiednie mechaniczne właściwości,
- Nie powinny wykazywać żadnej antygenowości – brak nawet minimalnej odpowiedzi zapalnej,
- Powinny być nietoksyczne,

- Ulegać kontrolowanej biodegradacji,
- Nie wywoływać bólu,
- Cechować się niskimi kosztami wytwarzania i przechowywania

Jednym z powszechnie wykorzystywanych w Polsce substytutów skóry jest Integra® [27]. Zbudowana jest ona z dwóch warstw: dolnej i wierzchniej. Warstwa dolna składa się z kolagenu bydłęcego i siarczanu 6-chondroityny (glikozaminoglikanu) pozyskiwanego z chrząstek rekina. Chondroityna stanowi podłoże dla regenerującej się tkanki. Warstwa wierzchnia składa się z cienkiej warstwy polisiloksanu i pełni funkcję zabezpieczającą. Warstwa ta jest usuwana w miarę postępu leczenia, natomiast warstwa dolna ulega resorpcji [28]. Zaletami Integry® jest jej natychmiastowa dostępność oraz fakt, że z czasem ulega ona całkowitej resorpcji, w związku z czym nie jest wymagane przeprowadzenie powtórnego zabiegu chirurgicznego w celu jej usunięcia. Ponadto, w przypadku stosowania tego preparatu nie obserwuje się odpowiedzi o charakterze zapalnym, czy typu ciała obcego. Integra® znalazła zastosowanie w leczeniu całych lub częściowych oparzeń skóry, owrzodzeniach żylnych i cukrzycowych oraz przewlekłych ranach [29,30]. Podobne zastosowanie kliniczne do Integra®, wykazuje Apligraf®. Preparat ten jest przykładem dwuwarstwowego, żywego ekwiwalentu skóry. Zawiera warstwę naskórka i skóry właściwej. *Dermis* zbudowana jest z kolagenu zwierzęcego typu I, wzbogaconego o żywe ludzkie skórne fibroblasty. Na zewnątrz, *dermis* pokryta jest warstwą żywych ludzkich keratynocytów, które są wyhodowane z noworodkowych napletków. W końcowej fazie hodowli, na granicy ciecz-powietrze, keratynocyty wytwarzają warstwę rogową. Produkt ten posiada zdolność do samoregeneracji. Histologicznie, Apligraf® przypomina ludzką skórę. Produkuje liczne cytokiny oraz czynniki wzrostu: IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, INF- α , INF- β , TGF- α , TGF- β , IGF-1 oraz PDGF. Brak jest w nim niektórych komórek skóry: komórek tłuszczowych, melanocytów i komórek Langerhansa, co przemawia za brakiem reakcji ostrego odrzucenia. Ograniczeniami w wykorzystaniu substytutu jest m. in. wysoki koszt preparatu oraz krótki czas jego przechowywania – pięć dni. Atutem, natomiast jest możliwość natychmiastowego wykorzystania oraz unikania rany w miejscu pobrania [31].

Biobrane® jest preparatem, który może być wykorzystany jako tymczasowy substytut skóry, spełniający rolę aktywnych biologicznie opatrunków [32]. Zbudowany jest z materiałów opartych o tkaninę poliamidową, powleconą cienką warstwą polisiloksanu i kolagenu [28]. Może być również zasiedlona keratynocytami. Biobrane® dobrze przylega do skóry, dzięki możliwości reakcji z czynnikami krzepnięcia krwi w ranie. Zaletą tej biosyntetycznej skóry jest obecność porów, które umożliwiają drenaż przesięku oraz przenikanie antybiotyków stosowanych miejscowo. Preparat przeznaczony jest głównie do leczenia ubytków naskórka oraz niewielkich ubytków skóry właściwej [27].

Whitaker w przeprowadzonych przez siebie badaniach wykazał, że Biobrane® powodowała u pacjentów wyraźne zmniejszenie dolegliwości bólowych [33].

Preparat TransCyte® jest pozakomórkową macierzą złożoną z allogennych ludzkich skórnych fibroblastów [31]. Jest substytutem wierzchniej warstwy skóry utworzony z półprzepuszczalnej warstwy polisiloksanu oraz siateczki poliamidowej, która jest pokryta kolagenem zwierzęcym, z wyhodowanymi na nim fibroblastami [15]. Po 4-6 tygodniach umieszcza się na folii silikonowej, dzięki czemu uzyskuje się produkt o zwartej komórkowej strukturze z licznymi ludzkimi białkami macierzy pozakomórkowej oraz wieloma czynnikami wzrostu. Następnie fibroblasty te są usuwane w wyniku zamrożenia. Zaletą produktu jest łatwość przechowywania oraz możliwość natychmiastowego zastosowania [34]. TransCyte® może mieć zastosowanie do leczenia oparzeń jako opatrunek, w czasie oczekiwania na biosyntetyczny substrat [15].

Innym przykładem substytutu skóry jest Alloderm®. Preparat ten stanowi bezkomórkową macierz, która powstała bezpośrednio ze skóry pobranej ze zwłok. Celem usunięcia naskórka, macierz preparowano w roztworze soli o dużym stężeniu oraz kąpano w roztworach do oddzielenia struktur komórkowych. W ostatnim etapie, macierz niedziałającą immunologicznie wraz z nienaruszonym kompleksem błony podstawnej i glikozaminoglikanami, poddawano suszeniu. Głównymi zaletami tego produktu są: jego natychmiastowa dostępność, brak komórek oraz brak reakcji immunologicznej. Ponadto, Alloderm® może być liofilizowany, przechowywany w stężonym glicerolu lub zamrożony [32].

5. Podsumowanie

Pomimo, że dzięki substytutom skóry chory może być leczony po wypadku i nie jest konieczne czekanie na wyhodowanie naskórka w laboratorium, dotychczas nie udało się stworzyć substytutu skóry, który spełniałby wszystkie wyżej wymienione warunki. Dlatego też, specjaliści z dziedziny inżynierii tkankowej i biotechnologii pracują nad opracowaniem optymalnego „zamiennika” skóry. Poszukiwanie coraz to nowszych i lepszych rozwiązań skutecznej regeneracji rozległych oparzeń jest wciąż bardzo aktualnym problemem. Mimo, że inżynieria tkankowa jest nową dziedziną, dotychczasowe jej osiągnięcia zachęcają do dalszych badań nad jej rozwojem. Wydaje się, że na przestrzeni ostatnich lat dużą szansę mają ekwiwalenty skóry wraz z tkanką zaszczerpioną na resorbowalnym rusztowaniu, który zbudowany jest z synte-tycznych polimerów.

Na przestrzeni ostatnich lat, uwagę naukowców z całego świata skupia możliwość wykorzystania komórek macierzystych. Rozwiązanie to okazuje się być niezwykle interesujące i może okazać się dobrym rozwiązaniem. Okazuje się, że sztuczna skóra z komórek macierzystych mogłaby rozwiązać problemy związane z odrzuceniem przeszczepów.

Literatura

- [1] Davis JS. *Address of the President: The Story of Plastic Surgery*. Ann Surg. 1941;113:641-56
- [2] Reverdin JL. *Grefe epidermique*. Bull Soc Imp Chir. 1869; 10:483-511
- [3] Drukała J. *Kokultury komórkowe w rekonstrukcji skóry w zastosowaniu klinicznym*. Postępy Biol Komórki 2001; 28: 97-110;
- [4] Girdner JH. *Skin Grafting with grafts taken from the dead subject*. M. Rec. 1881; 20:119-20
- [5] <http://bioinfo.mol.uj.edu.pl/articles/Lasota07>
- [6] Gallico GGD, O'Connor NE, Compton CC i wsp. *Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium*. New England Journal of Medicine 1984; 31: 448-451
- [7] Metcalfe AD, Ferguson MWJ. *Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration*. J.R. Soc. Interface 2007; 4: 413-437
- [8] Ostrowski K. Skóra. W: *Histologia*, red. K. Ostrowski, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1995, 790-814
- [9] Brohem CA, Cardeal LB, Tiago M wsp. *Artificial skin in perspective: concepts and applications*. Pigment Cell Melanoma Res. 2010; 24: 35-50
- [10] Chioni AM, Grose R. *Organotypic modelling as a means of investigating epithelial-stromal interactions during tumourigenesis*. Fibrogenesis Tissue Repair 2008; 1, 8, doi: 10.1186/1755-1536-1-8
- [11] <http://revealingpaws.com/revealingpaws/USA%20pages/Content%20USA/Glossary/Individual%20Words/Dermis.htm>
- [12] Shevchenko RV, James SL, James SE. *A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction*. J. R. Soc. Interface 2010; 7: 229-258
- [13] Gieryńska M, Schollenberger A, Spohr Cespedes I, Pawlak E. *Dendrytyczne epidermalne limfocyty T – strażnicy skóry*; Postępy Hig Med Dosw. (online), 2009; 63: 114-122
- [14] Langer R, Vacanti JP. *Tissue engineering*. Science 1993; 260: 920-926
- [15] Martkowicz M, Laska J. *Biomateriały polimerowe w regeneracji ubytków skóry*. Inżynieria Biomateriałów = Engineering of Biomaterials/Polskie Stowarzyszenie Biomateriałów 2010; 95: 2-9
- [16] Sabolinksi ML. et al.: *Cultured skin as a 'smart material' for healing wounds: experience in venous ulcers*. Biomaterials 1996; 17:311-20
- [17] Shieh S, Vacanti J. *State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building*. Surgery. 2005; 137:1-7
- [18] Tabata Y. *Recent progress in tissue engineering*. Research Focus 2001; 6: 483-487
- [19] Hata K. *Current issues regarding skin substitutes using living cells as industrial materials*. Journal of Artificial Organs 2007; 10: 129-132
- [20] Kaźnica A, Joachimiak R, Drewa T, Drewa G. *Zastosowanie inżynierii tkankowej w wybranych działach medycyny regeneracyjnej*. Med. Biol. Sci. 2007; 21: 9-14
- [21] Ramos-E-Silva M, Ribeiro de Castro MC. *New dressings, including tissue-engineered living skin*. Clinics in Dermatology 2002; 20: 715-723
- [22] Shores JT, Gabriel A, Gupta S. *Skin Substitutes and Alternatives: A Review*. Adv. Skin Wound Care 2007; 20: 493-508

- [23] Kumar P. *Classification of skin substitutes*. Burns 2008; 34: 148-149
- [24] Sheridan RL, Moreno C. *Skin substitutes in burns*. Burns 2001; 27: 92-92
- [25] Halim AS, Khoo TL, Shah JM: *Biologic and synthetic skin substitutes: An overview*. Indian J. Plast. Surg. 2010; 43: 23-28
- [26] van der Veen VC, Boekema BKHL, Ulrich MMW i wsp. *New dermal substitutes*. Wound Rep. Reg. 2011; 19: 59-65
- [27] Pham C, Greenwood J, Cleland H i wsp. *Bioengineered skin substitutes for the management of burns: A systematic review*. Burns 2007; 33: 946-957
- [28] Hansen SL, Voigt DW, Wiebelhaus P, Paul CN. *Using skin replacement products to treat burns and wounds*. Advances in Skin & Wound Care 2001; 14: 37-44
- [29] Papa G, Pangos M, Renzi N i wsp. *Five Years of Experience Using a Dermal Substitute: Indications, Histologic Studies, and First Results Using a New Single-Layer Tool*. Dermatol. Surg. 2011; 37: 1631-1637
- [30] Cuadra A, Correa G, Roa R i wsp. *Functional results of burned hands treated with IntegraR*. J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg. 2012; 65: 228-234
- [31] Cieślak K, Witkowski W, Drukała J i wsp. *Biotechnologiczne opatrunki i żywe substytuty skóry- przegląd i współczesne możliwości zastosowania*. Leczenie Ran 2005; 2: 71-83
- [32] Gosk J. *Materiały zastępcze skóry – terażniejszość i przeszłość*. Polim. Med. 2012; 42: 109-114
- [33] Whitaker IS, Prowse S, Potokar TS. *A critical evaluation of the use of Biobrane as a biologic skin substitute: a versatile tool for the plastic and reconstructive surgeon*. Ann. Plast. Surg. 2008; 60: 333-337
- [34] Holy CE, Cheng C, Davies JE, Shoichet MS. *Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering*. Biomaterials 2001; 22: 25-31

Substytuty skóry oraz inżynieria tkankowa w regeneracji ubytków skóry

Streszczenie

Regeneracja rozległych ubytków skórnych powstałych, na przykład na skutek urazu mechanicznego lub oparzenia ciągle stanowi poważny problem. Tkanki uszkodzone najczęściej leczy się chirurgicznie, farmakologicznie lub poprzez transplantację organów. Niestety, przeszczep narządów związany jest z wieloma ograniczeniami, takimi jak na przykład konieczność przyjmowania leków immunosupresyjnych. Leczenie ubytków skóry przy pomocy ekwiwalentów skóry lub z wykorzystaniem nowoczesnych metod inżynierii tkankowej jest obecnie najprężniej rozwijającą się dziedziną medycyny regeneracyjnej. Dynamiczny rozwój dziedziny inżynierii tkankowej umożliwia łączenie żywych komórek tkanki łącznej i naskórka z rusztowaniem złożonym z kolagenu lub materiału syntetycznego. Głównym celem inżynierii tkankowej jest stworzenie zdrowych i funkcjonalnych tkanek i organów, dzięki którym możliwe będzie zastąpienie tkanek uszkodzonych. Większość obecnych na rynku substytutów skóry obok licznych zalet, posiadają także wady, które skłaniają naukowców do poszukiwania nowych rozwiązań, których celem jest stworzenie najbardziej optymalnego substytutu skóry. Takie „idealne zamienniki” skóry powinny przede wszystkim umożliwić natychmiastowe uzupełnienie ubytku skóry, bez obawy odrzucenia przeszczepionego fragmentu.

Słowa kluczowe: substytuty skóry, inżynieria tkankowa

Skin substitutes and tissue engineering for skin regeneration

Abstract

Regeneration of extensive skin defects caused by trauma, such as burns or mechanical is still a serious problem. Damaged tissue most commonly treated surgically, pharmacologically or by transplantation of organs. Unfortunately, organ transplantation is associated with many limitations, such as the need for immunosuppressive medication. Treatment of skin defects using skin equivalents or using modern methods of tissue engineering is currently the most rapidly expanding field of regenerative medicine. The dynamic development of the field of tissue engineering allows to combine living cells and epidermal tissue of the scaffold composed of collagen or synthetic material. The main goal of tissue engineering is to create a healthy and functional tissues and organs, through which it will be possible to replace damaged tissues. Most of the current skin substitutes on the market along with many advantages, also have flaws that lead scientists to search for new solutions, which aim is to create the most optimal skin substitute. Such „ideal replacement for skin” should primarily enable immediate supplement the loss of the skin, without fear of rejection of the transplanted fragment.

Key words: skin substitutes, tissue engineering

Jolanta Karwat¹, Alicja Niedojadło, Paulina Gil-Kulik, Lidia Kotuła, Anna Grad, Karolina Gil, Katarzyna Kałakucka, Elżbieta Majewska, Martyna Markowska, Katarzyna Kulisz, Dominika Żmurek, Ewa Kołodziej

SUBSTANCJE ROŚLINNE POWODUJĄCE WZROST WYDATKU ENERGETYCZNEGO STOSOWANE W SUPLEMENTACH DIETY WSPOMAGAJĄCYCH REDUKCJĘ MASY CIAŁA

1. Wstęp

„Suplement diety to środek spożywczy, którego celem jest uzupełnienie normalnej diety, będący skoncentrowanym źródłem witamin, składników mineralnych lub innych substancji wykazujących efekt odżywczy lub inny fizjologiczny z wyłączeniem produktów mających właściwości produktu leczniczego w rozumieniu przepisów prawa farmaceutycznego” [1]. Przed omówieniem suplementów diety wykorzystywanych do redukcji masy ciała należy wspomnieć, że w organizmie wydzielanych jest wiele substancji/hormonów, które mają wpływ na regulację łaknienia i sytości oraz wydatku energetycznego, a tym samym na wartość bilansu energetycznego. Niektórym ziołowym suplementom przypisuje się działanie ułatwiające odchudzanie, gdyż ich czynne składniki mają właściwości zbliżone do hormonów obniżających łaknienie lub zwiększających wydatek energetyczny [2]. Na rynku dostępnych jest wiele suplementów stosowanych w celu ułatwienia redukcji masy ciała. Skuteczność ich nie jest jednak do końca potwierdzona. Część z nich może mieć poważne działanie niepożądane lub wchodzić w interakcje z lekami [3].

2. Rośliny i substancje stosowane w celu redukcji masy ciała

Głównym kryterium podziału suplementów roślinnych stosowanych w celu redukcji masy ciała jest ich podział ze względu na mechanizm działania.

Klasyfikacja ze względu na mechanizm działania:

- Powodujące wzrost wydatku energetycznego, m. in. *Ephedra spp.*, *Citrus aurantium ssp. amara*,
- Zwiększające utlenianie tłuszczu lub redukujące jego syntezę, m.in. *Garcinia cambogia*, *Camelia cinensis*, CLA,
- Powodujące wzrost uczucia sytości, m.in. guma guar, błonnik czy inulina,
- Modelujące metabolizm węglowodanów np. *Panax ginseng*
- Zwiększające eliminacje wody z organizmu, m.in. *Taraxacum officinale*,
- Inne; *Hoodia gordonii*, ocet jabłkowy [4].

¹ jolanta.karwat@wp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Zakład Genetyki Klinicznej

3. Surowce roślinne powodujące wzrost wydatku energetycznego

Głównym kierunkiem badania substancji pochodzenia naturalnego jest ich potencjalne działanie na receptory β_3 występujące w adipocytach, biorące udział zarówno w termogenezie jak i lipolizie. W badaniach przeprowadzonych na myszach i szczurach wykazano, że selektywna aktywacja receptorów β_3 powoduje wzrost lipolizy oraz zwiększenie wydatku energetycznego. Z kolei ich długotrwałe pobudzanie prowadzi do zmniejszenia magazynowanych zapasów tłuszczowych oraz do poprawy oporności na insulinę indukowaną otyłością [5].

Do najsilniej działających czynników termogenicznych zalicza się m.in. związki alkaloidowe efedrynę i synefrynę (bądź zawierające je surowce). Są to sympatykomimetyki wzmagające uwalnianie epinefryny i norepinefryny z zakończeń presynaptycznych układu współczulnego.

3.1. Efedryna

Obecnie efedryna jest najczęściej używana do zwiększenia termogenezy. Pochodzi głównie z suszonych młodych gałęzi krzewu *Ephedra sinica* (mahuang), można ją również otrzymać z innych krzewów z rodzaju *Ephedra* oraz z rośliny *Sidacordifolia*. Efedryna pod względem chemicznym jest zbliżona budową do amfetaminy, nazywana jest sympatykomimetykiem ponieważ działa na zakończenia nerwów współczulnych, które są odpowiedzialne przede wszystkim za fizjologiczną reakcję „walki i ucieczki”. Efedryna działa na mózg i cały ośrodkowy układ nerwowy, zwiększa aktywność fizyczną i wydolność nerwowo mięśniową [6].

Efedryna skutecznie wspomaga redukcję tkanki tłuszczowej. Jedną z przyczyn dla których efedryna jest tak potężnym środkiem jest to że działa ona poprzez wiele mechanizmów, wliczając w to podwyższanie stężeń norepinefryny, epinefryny, dopaminy oraz stymulując adrenoceptory typu α i β .

3.1.1. Kierunki działania efedryny

Ogranicza apetyt poprzez ułatwienie uwalniania adrenaliny i noradrenaliny stymuluje adrenoceptory α_1 , odpowiedzialne za redukcję łaknienia. Ocenia się, że redukcja łaknienia jest źródłem 75-80% utraty masy przypisywanej działaniu efedryny.

Zwiększa zużycie energii - 50 mg efedryny podane jednorazowo zwiększa całkowite zużycie energii o 4%, podczas gdy 60 mg efedryny przyjmowanej regularnie podwyższa tempo metabolizmu o 10%. Chociaż wszystkie typy adrenoceptorów (β_1 , β_2 , β_3 ,) odgrywają rolę w wywoływanej przez efedrynę termogenezie, stosunkowo szybko wytwarzana jest tolerancja na działanie efedryny w odniesieniu do efektów kardiowaskularnych, jednak jej działanie

termogeniczne wzrasta. Można to tłumaczyć bezpośrednim działaniem efedryny na adrenoreceptory β_3 , lub receptory "nietypowe", co odpowiada według badań za 40% termogenezy wywoływanej przez efedrynę [7].

Pobudza rozwój BAT (brunatnej tkanki tłuszczowej), jest szczególną tkanką, która raczej spala tłuszcz niż go gromadzi. Badania świadczą o tym, że większość krótkotrwałego wzrostu termogenezy pochodzi z mięśni i innych narządów wewnętrznych; jednak dłuższe stosowanie efedryny i innych substancji termogenicznych prowadzi następnie do wzrostu aktywności i przyrostu BAT.

Zwiększa syntezę białek - podobnie do Klenbuterolu stosowanego w celu utraty tłuszczu przy jednoczesnej ochronie mięśni efedryna jest antagonistą β_2 . Stymulując receptory β_2 zwiększa syntezę białek i przeciwdziała katabolizmowi czystemu zwłaszcza przy dietach niskokalorycznych.

Może zwiększać wydolność, gdy jest przyjmowana przed treningiem.

Utrata masy zwykle wiąże się z obniżeniem poziomu tzw. "dobrego" cholesterolu. Efedryna nie tylko temu zapobiega, ale również nieco odwraca ten proces, pozwalając na spadek "złego" cholesterolu o 10 mg/dl w ciągu sześciu miesięcy. Dla większości badanych był to spadek o 5-10%.

3.1.2. Działania niepożądane podczas suplementacji efedryny

W badaniach oceniających możliwość wystąpienia działań niepożądanych po spożyciu efedryny, stwierdzono, że stosowanie tego związku w dawkach powyżej 32 mg/dzień zwiększa ryzyko wystąpienia udaru krwotocznego. Dawki stosowane w celu redukcji masy ciała wynoszą 90-150 mg/dzień. Efedryna w dawce 25mg/dzień powodowała przyspieszenie akcji serca oraz podniesienie stężenia glukozy i insuliny, bez wpływu na ciśnienie skurczowe [8].

W raporcie zawierającym dane z lat 1997-1999, dotyczące występowania działań niepożądanych ze strony układu krążenia i ośrodkowy układ nerwowy po spożyciu alkaloidów *ephedra*, wymieniają opisane przypadki nadciśnienia, częstoskurczu, arytmii, udarów oraz przejściowych ataków niedokrwiennych. Wśród najpoważniejszych można wymienić zawały lub zatrzymanie akcji serca [9].

Najczęstsze to suchość w ustach, bezsenność, bóle głowy oraz nerwowość – wszystkie one zmniejszają się wraz z wydłużonym czasem stosowania. Poważniejsze skutki pojawiają się przy niewłaściwym jej stosowaniu – w większych, jednorazowych, nieregularnych dawkach [10]. Najlepsze działanie termogeniczne efedryny pojawia się dopiero wtedy gdy organizm nabył już tolerancję na inne działania niepożądane, takie jak podniecenie, nerwowość, podwyższone ciśnienie itp.

3.1.3. Objawy sercowo-naczyniowe

Stosowanie efedryny wiąże się ze wzrostem ciśnienia krwi oraz 2-3 krotnym wzrostem częstości akcji serca. Liczby te jednak są odczytywane nieprawidłowo w odniesieniu do zastosowania efedryny w procesie odchudzania. Badania mierzące wpływ efedryny na symptomy kardiovaskularne takie jak ciśnienie czy puls wskazują że przy długotrwałym stosowaniu bardzo szybko wytwarza się tolerancja na te negatywne efekty, podczas gdy wpływ na utratę tłuszczu utrzymuje się. Wynika to prawdopodobnie z bezpośredniego oddziaływania efedryny na receptory β_3 , podczas gdy tolerancja na efekt podwyższający wydzielanie noradrenaliny, adrenaliny i dopaminy rozwija się stosunkowo szybko [11].

3.1.4. Metabolizm glukozy

Efedryna może obniżać wrażliwość insulinową, przynajmniej na krótki okres. Dwa badania wykazały że efedryna podwyższa stężenie insuliny we krwi, w tym jedno z nich wykazało również że efedryna zmniejsza wchłanianie glukozy przy jednorazowym podaniu w dużej dawce. Dwa inne badania nie wykazały różnic w stężeniu insuliny i metabolizmie glukozy, ale prowadzono je przy ciągłym stosowaniu efedryny z kofeiną.

3.1.5. Uzależnienie

Wiele badań prowadzono w zakresie określenia wpływu efedryny na zwierzęta, porównując jej działanie do działania innych psychostymulantów takich jak kokaina czy amfetamina. Koncentrowano się głównie na badaniu uwalniania dopaminy. Podobnie jak kokaina czy amfetamina efedryna pobudza wydzielanie dopaminy. Jednak dużą rolę odgrywa tu sposób podawania – kokainę pali się lub wdycha, efedrynę w procesie odchudzania stosuje doustnie. U małp *Rhesus* efedryna wzmacniała działanie kokainy, a u uzależnionych szczurów działała jako jej zamiennik. Inne jednak badanie na szczurach zdawałoby się temu zaprzeczać gdyż nie odróżniały one roztworu efedryny od roztworu soli fizjologicznej [12].

W jednym z badań mających na celu określenie wpływu pojedynczej dawki efedryny, opartych na schemacie Addiction Research Centre Inventory (ARCI) stosowanym do pomiaru stopnia uzależnienia wywołwanego przez określony środek, jako podstawowy efekt psychologiczny zastosowania efedryny uznano "zmniejszone uczucie zmęczenia" i działanie efedryny nie zakwalifikowało do żadnej ze skał uzależnień, włączając tą typową dla amfetamin. W pełniejszym badaniu wpływ efedryny określono jako zwiększający euforię i niepokój, a natężenie tych efektów określono jako "o ponad połowę mniejsze niż w przypadku amfetaminy". Amfetamina dawała wyniki wyższe jeśli chodzi

o euforię a niższe w odniesieniu do niepokoju. Autor badań określił negatywny wpływ efedryny jako niski i porównywalny do wpływu kofeiny w odniesieniu do możliwości uzależnienia się od przyjmowanego środka. Znajduje to potwierdzenie w rzeczywistości – mimo, że efedryna jest na rynku legalnie od ponad 20 lat, zanotowano jedynie pojedyncze przypadki krótko lub długoterminowego nadużywania, niestety jednak i ze skutkiem śmiertelnym.

3.1.6. Neurotoksyczność

W badaniach na szczurach odkryto że jednorazowe duże dawki efedryny działają neurotoksycznie podobnie do amfetaminowego. Małe dawki efedryny nie dają takiego efektu. Studiów na ludziach nie prowadzono, ale w badaniu w którym przed długimi ćwiczeniami w podwyższonej temperaturze podawano 5 mg/kg m.c. kofeiny oraz 1 mg/kg efedryny odkryto że organizm sam broni się przed takimi działaniami poprzez mechanizmy zwiększonej utraty ciepła. Najlepszą więc metodą uniknięcia możliwej neurotoksyczności jest niestosowanie dużych jednorazowych dawek oraz picie dużych ilości wody [13].

W amerykańskim raporcie, który ukazał się w 2003 roku, podsumowującym skuteczność preparatów zawierających alkaloidy, a stosowanych w celu utraty masy ciała lub zwiększenia wydolności fizycznej, stwierdzono, że stosowanie środków zawierających efedrynę, efedrynę z kofeiną lub efedrynę i surowce kofeinowe było związane ze statystycznie znaczącą redukcją masy w stosunkowo krótkim czasie. Przy czym połączenie efedryny z kofeiną było skuteczniejsze w porównaniu z preparatami bez niej.

Stosowanie tych preparatów wiązało się z 2-3 razy większym ryzykiem wystąpienia nudności, wymiotów, zaburzeń psychicznych (zmiany nastroju i lęk) oraz palpacji serca. Preparat zawierający 72 mg efedryny i 240 mg kofeiny/dzień powodował znaczną redukcję wagi ciała i tkanki tłuszczowej w porównaniu do placebo. Zażywaniu tego preparatu towarzyszyły suchość w jamie ustnej, bezsenność i bóle głowy [14].

3.2. Synefryna

Citrus aurantium (pomarańcza gorzka) od dawna stosowana w celach spożywczych, kosmetycznych oraz ,medycznych jako środek goryczowy. Pomarańcza gorzka znalazła się niedawno w grupie roślin stosowanych w terapii otyłości ze względu na obecność działających sympatykomimetycznie alkaloidów: synefryny, oktopaminy, i hordeniny.

P-synefryna najaktywniejsza wśród alkaloidów, jej zawartość stanowi podstawę standaryzacji preparatów otrzymywanych z pomarańczy gorzkiej. Jest to substancja uznawana za substytut efedryny i ma podobną do niej budowę. Naturalną synefrynę zawierają niedojrzałe owoce cytrusowe (ok. 0,26%),

ale produkuje się także jej wersję syntetyczną i półsyntetyczną [10]. Na poziomie komórkowym działa na receptor β_3 , nasila uwalnianie norepinefryny co jest związane ze stymulacją lipolizy, pobudzeniem przemiany materii i zwiększeniem oksydacji tłuszczu przez nasilenie termogenezy. Związek ten w porównaniu z innymi sympatykomimetykami w mniejszym stopniu pobudza ośrodkowy układ nerwowy i układ sercowo-naczyniowy. Przypuszcza się, że jest to związane z mniejszą litofilnością synefryny i słabszym przechodzeniem bariery krew-mózg [1]. W jednym z ostatnich badań wykazano, że preparat zawierający synefrynę ułatwiał odchudzanie u otyłych osób, ale nie porównano go suplementami opartymi o efedrynę. Jednak inna praca, porównująca działanie standardowych dawek preparatów zawierających efedrynę oraz synefrynę (24 mg efedryny, 10mg synefryny; oba zawierały ponadto 300 mg kofeiny, 12 mg johimbiny i 200mg kwercetyny) u zdrowych młodych mężczyzn i kobiet. Jej wyniki zdecydowanie przemawiają na korzyść efedryny jako substancji termogennej i spalającej tłuszcz.

Wiele popularnych suplementów zawiera synefrynę połączoną z efedryną. Uważa się, że efedryna bardziej pobudza, a synefryna podtrzymuje termogenezę bez wyraźnego pobudzenia ośrodkowego układu nerwowego [15].

3.3. Oktopamina

Oktopamina ma podobną budowę do noradrenaliny, jest to kolejny sympatykomimetyk, działający antagonistycznie w stosunku do β_3 adreno-receptorów. Podobnie jak synefryna, która w odróżnieniu od adrenaliny tylko redukuje grupę $-OH$, oktopamina jest bardziej podobna do noradrenaliny, z wyłączeniem fenolowej grupy hydroksylowej. To sprawia, że molekula jest zdolna do przejścia granicy krew-mózg, podobnie jak zwykła noradrenalina. Także brak grupy metylowej przy azocie, daje jej właściwości adrenergiczne alfa i beta. Z powodu braku grupy hydroksylowej położonej w punkcie-M, oktopamina, podobnie jak synefryna, nie jest metabolizowana przez COMT, zatem ma dłuższy czas połowicznego rozpadu i lepszą biodostępność. Istotnie, w badaniach na zwierzętach *in vivo*, oktopamina ujawniła zdolność do stymulacji obu receptorów adrenergicznych α i β . Jednakże dosyć selektywnie stymuluje receptory adrenergiczne β_3 , które promują lipolizę, w zamian za receptory β_1 i β_2 [16]. Uwrażliwia tkanki na działanie insuliny, tym samym regulując gospodarkę cukrową organizmu. Warto zauważyć, że wyniki badań wykazały obniżenie stężenia insuliny w osoczu u otyłych szczurów po zastosowaniu oktopaminy. W jednym z badań wykazano też, że podawanie oktopaminy pomaga obniżyć tempo nabierania masy u otyłych szczurów bez żadnych działań niepożądanych, jednak jest to metoda mniej efektywna niż zastosowanie agonistów β_3 -AR [17].

W ten sposób może blokować negatywne skutki krytycznego spadku stężenia cukru we krwi w przypadku głodówki lub wyczerpania energetycznego następującego przy intensywnym wysiłku fizycznym. Oktopamina HCL, nie wywołuje uczucia rozdrażnienia ani drżenia rąk. Oprócz tego, jak wskazują badania, działa antykataboliczne na tkanki mięśniowe.

3.4. Hordenina

Hordenina jest aminą powstającą z tyrozyny – działa podobnie jak efedryna. Wpływa na pracę przewodu pokarmowego, zmniejsza apetyt między posiłkami i zmniejsza ilość pożywienia powodując uczucie sytości. Dodatkowo, hordenina pomaga "wykasować" w mózgu informację o dotychczasowo utrzymywanej wadze. Zazwyczaj w przypadku odchudzania po pewnym czasie organizm dąży do przywrócenia poprzedniej wagi. Dzięki hordeninie nie dochodzi do efektu "jo-jo", ponieważ działa jeszcze długo po jej odstawieniu. Hamuje wychwyty norepinefryny (tym samym przyczynia się do nasilenia procesów termogenicznych), zwiększa wytwarzanie dopaminy (co pozytywnie wpływa na samopoczucie).

4. Podsumowanie

W badaniach na szczurach, którym przez 7 dni podawano wodno-alkoholowe wyciągi z *Citrus aurantium*, standaryzowane na zawartość synefryny (4 i 6%), w dawkach 2,5-20 mg/kg. Stwierdzono zmniejszenie ilości pobieranego pokarmu oraz utratę masy ciała w porównaniu z grupą kontrolną. Podawanie doustne przez 15 dni nie wpłynęło na ciśnienie krwi zwierząt otrzymujących ekstrakt z pomarańczy gorzkiej, natomiast zapis EKG przedstawił komorowe zaburzenia rytmu z szerokim zespołem QRS. W grupie zwierząt otrzymujących wyciąg zawierający 6% synefryny stwierdzono statystycznie znamienne wzrost śmiertelności [18]. W badaniach klinicznych dobre skutki w redukcji masy oraz tkanki tłuszczowej wykazano w trwającym 6 tygodni eksperymencie, w czasie którego pacjentom podawano mieszankę zawierającą 975 mg ekstraktu z *C. aurantium* 528 mg kofeiny i 900mg wyciągu z *Hypericum perforatum*. Dodatkowo pacjenci mieli dobraną odpowiednią dietę i wykonywali ćwiczenia fizyczne.

W grupie otrzymującej badaną mieszankę stwierdzono redukcję masy ciała o 1,4 kg w porównaniu do 0,9 kg w grupie kontrolnej. Stosowane w badaniach ekstraktyz pomarańczy gorzkiej były jednak wyższe od zawartych w preparatach obecnych na rynku (100-200 mg wyciągu co odpowiada dawce 10-40 mg synefryny) [19]. Niektórzy badacze twierdzą, że stosowanie tylko ekstraktu z pomarańczy gorzkiej w umiarkowanych dawkach nie wpływa na ciśnienie krwi, natomiast po podaniu preparatów złożonych zawierających kofeinę może

nastąpić jego znaczący wzrost [9]. Uważa się, że *Citrus aurantium* może być substytutem efedryny o działaniu termogennym, jednak z zastrzeżeniem, że konieczne są dalsze badania w celu potwierdzenia jej skuteczności i bezpieczeństwa [15].

Najsukuteczniejszym preparatem okazała się efedryna. Udowodniono iż działa ona poprzez wiele mechanizmów i pomaga w redukcji tkanki tłuszczowej na wielu etapach (ogranicza apetyt, zwiększa zużycie energii, pobudza rozwój BAT, zwiększa syntezę białek oraz wydolność treningową) co w konsekwencji powoduje redukcję masy tłuszczowej ciała bez utraty masy mięśniowej. Niekorzystny wpływ na układ krążenia oraz działania niepożądane takie jak suchość w ustach, bezsenność czy bóle głowy zmniejszają się wraz z czasem stosowania podczas gdy wpływ na redukcję tkanki tłuszczowej utrzymuje się. Efedryna przy zachowaniu odpowiedniego zalecanego dawkowania jest skutecznym i stosunkowo bezpiecznym suplementem pomagającym pozbyć się niechcianych kilogramów. Synefrynę można uznać za słabiej działającą substytut efedryny, który w mniejszym stopniu pobudza układ sercowo-naczyniowy i ośrodkowy układ nerwowy. Zaleca się stosowanie suplementów zawierających synefrynę połączoną z efedryną ponieważ udowodniono, iż synefryna podtrzymuje termogeniczne działanie efedryny. Oktopamina wykazała właściwości pomagające obniżyć tempo nabierania masy u otyłych natomiast wyniki badań co do jej działania termogenicznego nie dają jednoznacznych odpowiedzi.

Literatura

- [1] Park J., Kelly L.; *The effect of biogenic amines and their analogs on carbohydrate metabolism in the fat body of the cockroach Blaberus discoidalis*, Gen Comp Endocrinol. 1998; 110: 88-95.
- [2] Vido L., Facchin P., Antonello I., Gobber D., Rigon F. *Childhood obesity treatment: double blinded trial on dietary fibres (glucomannan) versus placebo*, Padiatr Padol. 1993; 28: 133-136.
- [3] Schlegel G., Ringseis R., Shibani M., Most E., Schuster M., Schwarz F. J., Eder K. *Influence of a rumen-protected conjugated linoleic acid mixture on carcass traits and meat quality in young simmental heifers*, J Anim Sci. 2012; 90: 1532-1540.
- [4] Białkowska M., Stoś K. *Suplementy diety wspomagające terapię otyłości*, Lekarz. 2007; 9: 2-8.
- [5] Kalman D., Colker C., Shi Q. et al. *The metabolism of orally ingested 19-nor-4-androstene-3,17-dione and 19-nor-4-androstene-3,17-diol in healthy, resistance-trained men*, J Strength Cond Res. 2001; 15: 144-147.
- [6] Gomez R. *Doping i jego alternatywy, doping ukierunkowany na redukcję masy ciała*, Kulturystryka i Fitness. 2002; 4: 20-21.
- [7] Sus-Nowosielski K. *Doping nie tylko w sporcie: przyczyny, skutki, przeciwdziałanie*, Katowice, PWN, 2002.

- [8] Andraws R., Chawla P., Brown D. *Cardiovascular effects of ephedra alkaloids: a comprehensive review*, Prog Cardiovasc. 2005; 47: 217.
- [9] Haller C., Jacob P., Benowitz N. *Human pharmacology of a performance-enhancing dietary supplement under resting and exercise conditions*. Br J Clin Pharmacol. 2008; 65: 4833
- [10] Boozer C., Nasser J., Heymsfield S. et al. *An herbal supplement containing Ma Huang-Guarana for weight loss: a randomized, double blind trial*, Int J Obes Relat Metab Disord. 2001; 25: 316.
- [11] Abourashea E., L-Alfy A., Khan I. et al. *Ephedra in perspective – a current review*, Phytother Res. 2003; 17: 703.
- [12] Stefaniak T., Witkowski K., Burdziłowska M. *Ocena wpływu niedozwolonych środków dopingujących na wybrane stany emocjonalne osób uprawiających sporty siłowe i kulturystykę*, Medical Sportiva. 2006; 3: 383-387.
- [13] Gomez R.; *Doping i jego alternatywy*. Techniki żywienia, Kulturystyka i Fitness. 2002; 1: 20-21.
- [14] Shekelle P., Marton S., Maglione M. et al. *Ephedra Ephedrine for Weight Loss and Athletic Performance Enhancement. Clinical Efficacy and Site Effect*. Evidence Report, Technolog Assosment. 2006; 76: 165.
- [15] Preuss H. G., DiFerdinando D., Bagchi M., Bagchi D. *Citrus aurantium as a thermogenic, weight-reduction replacement for ephedra: an overview*, J Med. 2002; 33: 247-64.
- [16] Soni M. G., Burdock G. A., Preuss H. G. *Safety assessment of (-)-hydroxycitric acid and Super CitriMax, a novel calcium/potassium salt*, Food Chem Toxicol. 2004; 42: 1513-1529.
- [17] Carpeno C., Galidzky J., Fontana E. et al. *Selective activation of beta 3-adrenoceptors by octopamine: comparative studies in mammalian fat cells*, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1999; 359: 310.
- [18] Calapai G., Crupi A., Firenzuoli F. et al. *Serotonin, norepinephrine and dopamine involvement in the antidepressant action of hypericum perforatum*, Pharmacopsychiatry. 2001; 34: 45-9.
- [19] Colker C., Kalman T., Torina G. et al. *The effects of pyruvate supplementation on body composition in overweight individuals*, Nutrition. 1999; 15: 337-340.
- [20] Ustawa o Bezpieczeństwie Żywności i żywienia z 25 sierpnia 2006.

Substancje roślinne powodujące wzrost wydatku energetycznego stosowane w suplementach diety wspomagających redukcję masy ciała

Streszczenie

„Suplement diety to środek spożywczy, którego celem jest uzupełnienie normalnej diety, będący skoncentrowanym źródłem witamin, składników mineralnych lub innych substancji wykazujących efekt odżywczy lub inny fizjologiczny z wyłączeniem produktów mających właściwości produktu leczniczego w rozumieniu przepisów prawa farmaceutycznego”. Istnieje wiele suplementów zalecanych jako środki wspomagające odchudzanie. Skuteczność większości z nich nie jest jednak potwierdzona w badaniach naukowych. Część z nich może mieć poważne działania niepożądane i/lub może wchodzić w interakcje z lekami. Przy ewentualnym wyborze suplementu jako środka wspierającego odchudzanie wszystkie te aspekty powinny być brane pod uwagę. W organizmie wydzielanych jest wiele substancji/ hormonów, które wpływają na regulację łaknienia i sytości oraz wydatku energetycznego, a tym samym na wartość bilansu energetycznego. Są one wytwarzane przez komórki różnych układów organizmu, a skutkiem ich działania może być zmniejszenie bądź zwiększenie wydatku energetycznego. Niektórym ziołowym suplementom przypisuje się działanie ułatwiające odchudzanie, gdyż ich czynne składniki mają właściwości zbliżone do hormonów obniżających łaknienie lub zwiększających wydatek energetyczny. W pracy przedstawiono podział suplementów roślinnych wspomagających odchudzanie oraz omówiono korzystne i niekorzystne działanie suplementów zawierających substancje roślinne powodujące wzrost wydatku energetycznego.

Słowa kluczowe: suplementy, substancje roślinne, redukcja masy ciała, otyłość

Plant compounds resulting increase energy expenditure used in food supplements to support weight reduction

Abstract

A dietary supplement is a food, which aims to supplement the normal diet, being a concentrated source of vitamins, minerals or other substances with a nutritional or other physiological excluding the products having the properties of a medicinal product within the meaning of the pharmaceutical law. There are many supplements recommended as supporting weight losing agents. The effectiveness of majority of them is not confirmed by researches. Part of them may have serious side effects and/or may interact with other drugs. All of these aspects should be taken into consideration while choosing supplement as supporting sliming agent. Many substances/hormones are secreted in human body. They have influence on regulation of appetite and satiety, and also on energy expenditure, thereby on energy balance. They are produced by different body systems cells and decrease or increase of energy expenditure may be effects of their activities. Helpful influence on losing weight is attributed to some herbal supplements, because their active elements have similar properties to hormones, which decrease or increase energy expenditure. The paper presents the classification of plant supplements supporting weight loss and discusses the positive and negative effects of supplements containing plant substances resulting in increase energy expenditure.

Keywords: supplements, plant substances, weight loss, obesity

Sylwia Katarzyna Król¹, Dorota Choroszyńska², Anna Wawruszak^{3,4},
Karolina Okła⁵

TRÓJWYMIAROWE HODOWLE KOMÓRKOWE – BRAKUJĄCE OGNIWO MIĘDZY MODELAMI *IN VITRO* I *IN VIVO*?

1. Wprowadzenie

Celem niniejszej pracy jest zaprezentowanie techniki hodowli komórek *in vitro* w modelu trójwymiarowym (3D), jako potencjalnego brakującego ogniwa pomiędzy „płaską”, dwuwymiarową (2D) hodowlą komórkową, a złożoną, przestrzenną strukturą żywego organizmu.

Opracowanie metodyki hodowli komórek i tkanek w warunkach *in vitro* na początku XX wieku zrewolucjonizowało świat nauk biologicznych i medycznych. Technika ta jest od tamtej pory wykorzystywana na szeroką skalę zarówno w badaniach podstawowych jak i badaniach o charakterze aplikacyjnym, ze względu na liczne zalety. Przede wszystkim, hodowle komórkowe i tkankowe stanowią stosunkowo łatwy model do badania i umożliwiają standaryzację wszystkich metod i procedur, pozwalając tym samym na uzyskiwanie powtarzalności prowadzonych badań oraz ich rezultatów. Dzięki temu możliwe jest porównywanie wyników poszczególnych analiz i wyciąganie właściwych wniosków. Dodatkowym atutem jest też oszczędność czasu i miejsca [1, 2].

Przykłady wykorzystania hodowli komórkowych/tkankowych *in vitro*:

- poszukiwanie nowych leków (np. przeciwnowotworowych) i testowanie ich toksyczności,
- analizy toksykologiczne ksenobiotyków,
- testowanie nowych produktów kosmetycznych,
- produkcja szczepionek,
- hodowle tkanek do transplantacji,
- badanie reakcji immunologicznych,

¹ sylwia_krol15@wp.pl, Uniwersytety Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, www.umlub.pl

² dorota.choroszynska@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, www.umlub.pl

³ anna_wawruszak@interia.pl, Uniwersytety Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Katedra i Zakład Biochemii i Biologii Molekularnej, www.umlub.pl

⁴ Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów „Mikron”, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, www.umcs.lublin.pl

⁵ lolikik@o2.pl, Studenckie Koło Naukowe Biotechnologów „Mikron”, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, www.umcs.lublin.pl

- badanie interakcji międzykomórkowych,
- wytwarzanie rekombinowanych białek, enzymów, wektorów wirusowych,
- wytwarzanie przeciwciał monoklonalnych,
- jako środowisko do hodowli wirusów [1, 2, 3].

2. 2D versus 3D

Tradycyjne badania *in vitro* prowadzone są z wykorzystaniem modeli 2D, jakimi są kultury komórkowe lub tkankowe hodowane na płytkach, szalkach Petriego lub w specjalnych plastikowych butelkach. Jednakże, coraz większa liczba badaczy zaczyna podważać słuszność i kwestionować znaczenie badań na żywych komórkach, utrzymywanych w warunkach tak dalece odmiennych od tych, jakie naturalnie występują w żywym organizmie [4]. Przede wszystkim żywe organizmy, a więc ich poszczególne tkanki i organy stanowią skomplikowane, trójwymiarowe (3D) struktury, będące skupiskami komórek, które mają kontakt i komunikują się nie tylko między sobą, ale również z wieloma innym rodzajami komórek/tkanek, tworzących ich naturalne otoczenie *in vivo* [5]. Zatem środowisko życia komórek w tkankach i narządach żywego organizmu jest skomplikowanym i trójwymiarowym układem, które nieprzerwanie oddziałuje na te komórki, modulując ich wzrost i rozwój. Wiadomo na przykład, że komórki lub tkanki hodowane na płaskich powierzchniach, czyli w postaci struktur 2D charakteryzują się nieco zmienionym metabolizmem, wzrostem i ekspresją genów. W związku z tym, 2D kultury komórek nie mogą w pełni poprawnie odzwierciedlać warunków oraz procesów zachodzących w żywych organizmach [6]. Co więcej, środowisko hodowli komórkowej 2D ciągle się zmienia, gdyż substancje odżywcze są wykorzystywane przez rosnące i dzielące się komórki, a nagromadzeniu ulegają zbędne i szkodliwe produkty przemian metabolicznych. Wymaga to sztucznej ingerencji ze strony człowieka, celem zapewnienia jak najbardziej optymalnych warunków rozwoju poprzez dostarczenie nowej porcji niezbędnych substancji odżywczych, czyli zmianę medium hodowlanego na świeże. Jednakże z uwagi na brak praktycznie jakiegokolwiek alternatyw dla tego rodzaju hodowli, do niedawna testy *in vitro* były prowadzone w zdecydowanej większości tylko z udziałem modeli 2D [5].

Obecnie obserwuje się wzrastające zainteresowanie potencjalnym wykorzystaniem kultur komórkowych 3D w badaniach podstawowych, testowaniu nowych leków, inżynierii tkankowej czy medycynie regeneracyjnej. Uważa się, iż hodowle 3D stanowią bardziej odpowiedni model do długoterminowych i złożonych badań *in vitro*, niż hodowle 2D. Badania wykazują, że cechy i struktura komórek hodowanych w ten sposób są bardziej podobne do tych, które występują *in vivo* [6].

Intensywne prace nad wytwarzaniem konstrukcji i rusztowań, które pozwolą na prowadzenie hodowli komórkowych i tkankowych w postaci struktur 3D trwają

już od ponad 30 lat. W tym czasie naukowcom udało się przetestować wiele naturalnych jak również syntetycznych materiałów, które potencjalnie mogą znaleźć szerokie zastosowanie w hodowlach komórek i tkanek w 3D. Pozwoli to na uzyskiwanie wiarygodnych rezultatów, porównywalnych z modelami *in vivo*. Dodatkowym atutem jest możliwość tworzenia *in vitro* konstruktów, które mogą zastąpić lub zregenerować zniszczone lub uszkodzone tkanki i organy. Tak więc stopniowe doskonalenie metod hodowli komórkowych i tkankowych w 3D prowadzi jednocześnie do rozwoju nowej i bardzo ważnej interdyscyplinarnej gałęzi nauki – inżynierii tkankowej, będącej połączeniem wielu dziedzin, takich jak biologia, chemia, medycyna, czy inżynieria materiałowa.

3. Rodzaje hodowli przestrzennych

Hodowle przestrzenne lepiej niż tradycyjne (czyli dwuwymiarowe) kultury komórkowe *in vitro* odzwierciedlają strukturę i funkcje tkanek, narządów obecnych w żywych organizmach, dzięki odtworzeniu właściwego mikrośrodowiska oraz wzajemnych powiązań i kontaktów pomiędzy komórkami. Do hodowli 3D zaliczamy agregaty, sferoidy, hodowle narządowe, kokultury organotypowe, obejmujące również hodowle spolaryzowane. Poniżej przedstawiono krótką charakterystykę każdego z tych rodzajów hodowli.

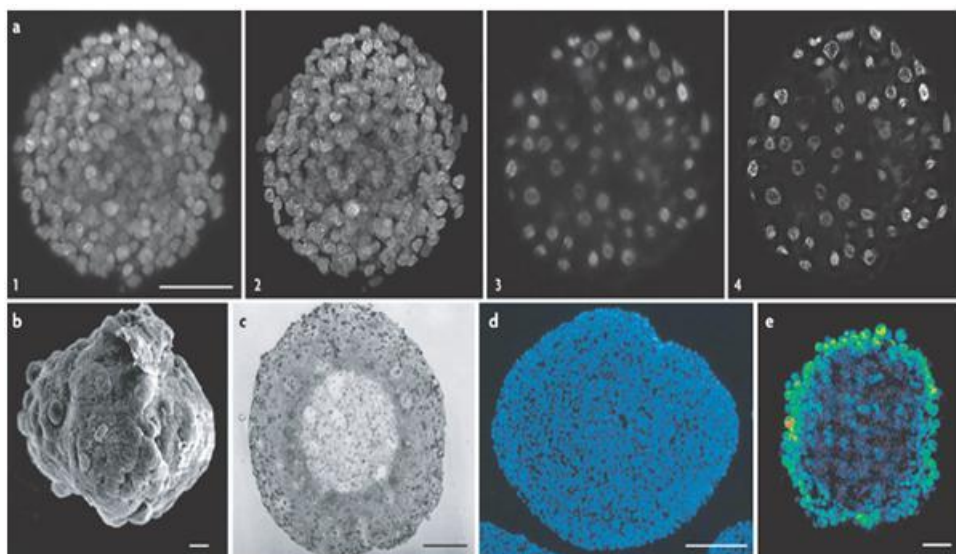
3.1. Agregaty

Agregaty mogą być tworzone przez jeden lub kilka typów komórek. Tworzy się je poprzez umieszczenie zawiesiny komórek w specjalnym naczyniu (butelce, kolbce), które podlega rotacji z małą prędkością [7]. Otrzymane agregaty mają różną wielkość. Możliwe jest również uzyskanie agregatów po wysianiu komórek na podłoże pokryte substancją zapobiegającą przyklejaniu się komórek (np. agarozą lub agar) [8, 9].

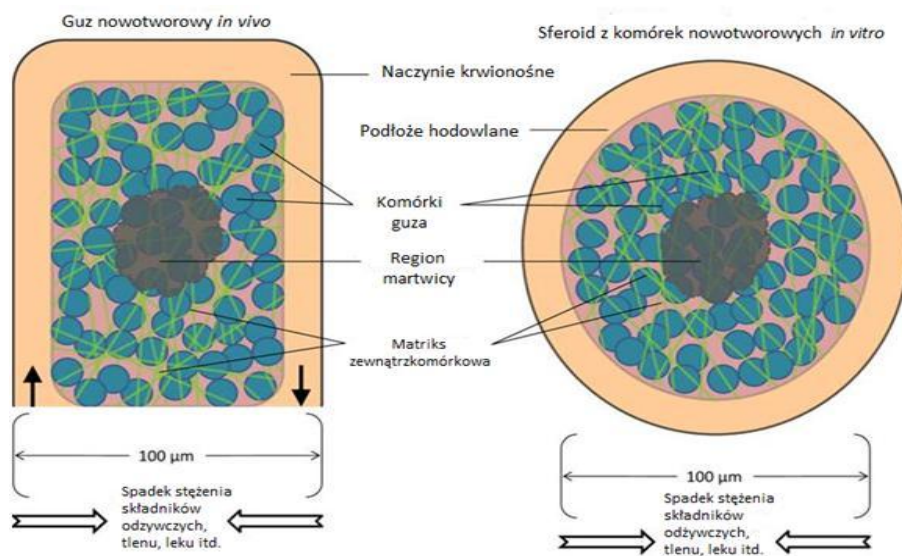
W agregatach stwierdza się obecność macierzy zewnątrzkomórkowej oraz połączeń międzykomórkowych, dzięki czemu istnieje funkcjonalne podobieństwo do żywej tkanki. Uważa się, że optymalna średnica takiego agregatu komórkowego powinna wynosić ok. 250-500 μm , gdyż wtedy substancje odżywcze i tlen docierają do każdej komórki w tej strukturze. Komórki są żywotne i proliferują także we wnętrzu agregatu [1]. Agregaty są najbardziej użyteczne w hodowlach komórek o wysokim stopniu zróżnicowania, które przejawiają dość krótki okres aktywności. Mogą być również wykorzystywane do analizy stopnia apoptozy i oceny inwazyjności komórek nowotworowych pochodzących z różnego rodzaju guzów [10]. Agregaty są bardzo dobrym modelem do badań wpływu różnorodnych czynników (odżywczych, wzrostowych, hormonalnych, ksenobiotycznych itd.) na wzrost, procesy metaboliczne, proliferację i przeżywalność komórek prawidłowych jak i nowotworowych [1]. Przykładowo, agregaty utworzone przez komórki nerwowe mózgu znalazły zastosowanie w badaniach nad chorobami neurodegeneracyjnymi, takimi jak choroba Alzheimera czy Parkinsona [11].

3.2. Sferoidy

Sferoidy tworzą się z agregatów, które przekroczyły w hodowli maksymalną średnicę pojedynczego agregatu ($> 500 \mu\text{m}$) (Rys. 1.). Przy średnicy powyżej 600-800 μm we wnętrzu agregatu obserwuje się centralnie położony obszar martwicy, otoczony przez żywe komórki [1]. Sutherland i współpracownicy po raz pierwszy wprowadzili hodowle wielokomórkowych sferoidów nowotworowych MCTS (Multicellular tumor spheroids). Sferoidy w hodowlach *in vitro* przypominają guzy nowotworowe w żywych organizmach i naśladują je znacznie lepiej niż klasyczne, jednowarstwowe hodowle, między innymi dzięki obecności macierzy pozakomórkowej oraz połączeń międzykomórkowych spotykanych *in vivo* [12]. Służą one do badań nad zagadnieniami dotyczącymi biologii nowotworów, takimi jak proliferacja, procesy różnicowania, angiogeneza, inwazyjność oraz zjawisko oporności na standardowo stosowane rodzaje terapii [13]. Sferoidy te funkcjonują jak wczesny, nieunaczyniony guz *in vivo* lub jak nieunaczynione ogniska przerzutowe albo mikroobszary nowotworowe (Rys. 2). Możliwe jest również odtworzenie heterogenności guzów nowotworowych poprzez wytworzenie sferoidów z komórek nowotworowych i prawidłowych gospodarza. Sferoidy utworzone z materiału biopsyjnego wykorzystywane są przeważnie w testach nowych, potencjalnych leków przeciwnowotworowych, celem prognozowania skuteczności terapii. Sferoidy zbudowane z komórek pochodzących z ustalonych linii wydają się być dobrym modelem w badaniach mechanizmów kontrolujących przenikanie, działanie i interakcje substancji leczniczych. Hodowle sferoidów są również stosowane w badaniach wpływu czynników odżywczych na procesy metaboliczne i wzrostowe komórek w warunkach *in vitro* [1].



Rys. 1. Przykłady sferoidów komórkowych – obrazy wykonane z udziałem różnych technik mikroskopii [14]



Rys. 2. Podobieństwa pomiędzy guzem nowotworowym *in vivo*, a sferoidem nowotworowym *in vitro* [15, zmodyfikowany]

3.3. Hodowle narządowe

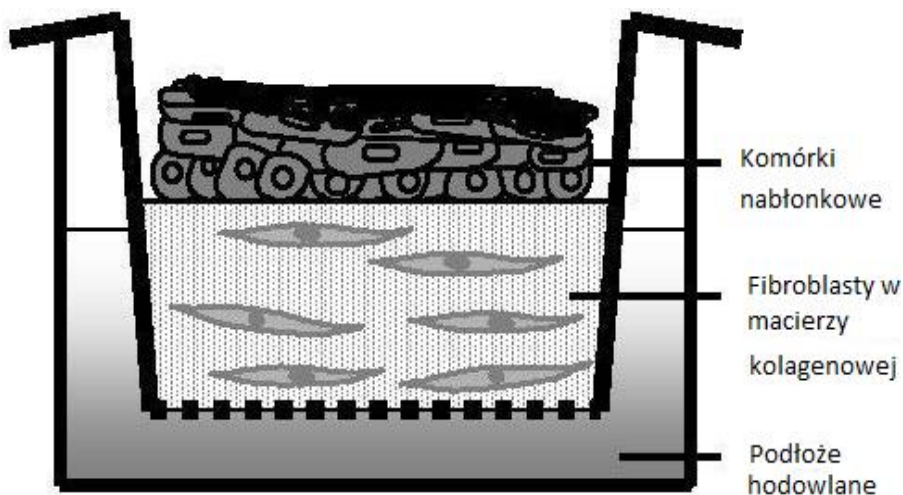
Hodowla narządowa polega na hodowli małych narządów (w całości) lub fragmentów większych organów i tkanek w warunkach *in vitro*. Zachowana zostaje strukturalna integralność, interakcje komórkowe, biochemiczne, histologiczne oraz funkcjonalne zróżnicowanie tkanki lub narządu. W związku z tym uważana jest za model fizjologiczny – najlepiej odzwierciedlający stan tkanek i organów w żywym organizmie. Takie hodowle przeżywają kilka dni w mniej więcej niezmienionej postaci, mimo możliwości pojawienia się ognisk martwiczych wewnątrz większych fragmentów. Zazwyczaj nie obserwuje się wzrostu takich hodowli. Wykazują one jedynie żywotność i funkcjonalność poprzez np. reagowanie na określone czynniki wprowadzane do podłoża. Odpowiednio dobrane płynne medium hodowlane oraz wielkość narządu lub jego fragmentu muszą być uwzględnione, aby uzyskiwane wyniki były wiarygodne i zadowalające [1]. Najbardziej odpowiednie do tego rodzaju hodowli wydają się narządy płaskie, takie jak np. gruczoł mlekowy myszy, przepona czy tkanki zarodkowe ssaków. Ze względu na możliwość wykonywania ograniczonej liczby powtórzeń badań, hodowle narządowe jeszcze do niedawna nie cieszyły się zbyt dużym zainteresowaniem. Hodowle narządowe mogą dostarczać informacji na temat biologii rozwoju i interakcji poszczególnych tkanek, wzajemnych kontaktów pomiędzy komórkami i niekomórkowymi składnikami mikrośrodowiska danego narządu, co niewątpliwie może pomóc w konstruowaniu modeli tkankowych i narządowych w warunkach *in vitro* [1].

3.4. Kokultury organotypowe

Kokultury organotypowe są hodowlami dwóch lub większej liczby typów komórek w modelu trójwymiarowym. Wykazują one wiele cech charakterystycznych tego organu lub tkanki, z którego zostały pozyskane. Przykładem może być kokultura endometrium, które posiada złożoną wielowarstwową strukturę. *In vivo*, komórki endometrium z jednej strony kontaktują się ze światłem macicy, a z drugiej strony z łącznotkankowym podścieliskiem, zawierającym gruczoły. Komórki nabłonkowe charakteryzują się budową biegunową i spoczywają na błonie podstawnej. W kokulturze endometrium komórki rozwijają się, namnażają i przejawiają aktywność wydzielniczą podobną do tej, jaką prezentują komórki endometrium *in vivo*.

Prowadzenie takich spolaryzowanych kokultur organotypowych stało się możliwe dzięki zastosowaniu specjalnych wkładów (insertów) do naczyń hodowlanych z filtrami o odpowiedniej wielkości porów (Rys. 3.). Dno takiego insertu stanowi półprzepuszczalna błona, którą pokrywa się odpowiednią ECM, a w dalszej kolejności komórkami nabłonkowymi. Na dno głównego naczynia, powleczone wcześniej np. kolagenem lub bezpośrednio do ECM wysiewa się fibroblasty. Ten wzajemny układ komórek charakteryzuje się biegunowością,

taką jaka występuje *in vivo*. Pozwala to na prawidłowe odtworzenie w warunkach *in vitro* morfologii komórek jak najbardziej zbliżonej do fizjologicznej i uzyskanie polaryzacji (biegunowość) np. komórek nabłonkowych z mikrokosmkami obecnymi tylko na jednym biegunie komórki. Kokultury organotypowe mogą być wykorzystane do hodowli komórek jajnika, jądra, przysadki, podwzgórza lub gruczołu mlekowego [1]. Dzięki wykorzystaniu komórek autologicznych człowieka można uzyskać kokulturę organotypową skóry, a z niej w ciągu kilku tygodni (mniej niż miesiąc) znaczące fragmenty skóry, którą można wykorzystać u pacjentów z ciężkimi poparzeniami [16].



Rys. 3. Schemat systemu do prowadzenia hodowli organotypowych [17, zmodyfikowany]

4. Udział macierzy pozakomórkowej w tworzeniu naturalnego rusztowania *in vivo*

Macierz pozakomórkowa (ECM, extracellular matrix) jest kompleksem makrocząsteczkowym (białkowo-cukrowym), stanowiącym naturalne rusztowanie i podłoże dla komórek i tkanek w żywych organizmach. Wytwarzana jest przez szereg wyspecjalizowanych komórek, takich jak np. fibroblasty, miofibroblasty, chondrocyty, osteoblasty [18, 19].

Główne składniki ECM to:

- włókna kolagenu typu I-V i IX oraz elastyny, zapewniające wytrzymałość i jednocześnie elastyczność,
- cząsteczki adhezyjne, takie jak fibronektyna i laminina, które odpowiadają za połączenia pomiędzy macierzą, a powierzchnią komórek,

- proteoglikany, czyli białkowe rdzenie połączone z resztami cukrowymi, dzięki nim ECM ma znaczną objętość i wypełnia przestrzeń między komórkami [18, 20].

ECM stanowi mechaniczną podporę dla komórek i tkanek, odpowiada za scalanie komórek danego rodzaju w tkanki. Macierz pozakomórkowa warunkuje również prawidłowy wzrost, proliferację i procesy różnicowania się komórek, ich kształt i ruchliwość, a także przekazywanie specyficznych sygnałów pomiędzy poszczególnymi komórkami, dzięki obecności receptorów adhezyjnych. Bierze udział w naturalnej regeneracji uszkodzonych tkanek. Substancje zawarte w ECM odpowiadają za przyleganie komórek do elementów macierzy, a także wzajemne przyleganie komórek między sobą i do błony podstawnej [20, 21, 22].

Naukowcy ciągle badają możliwość hodowli komórek na specjalnie zaprojektowanych w tym celu różnego rodzaju rusztowaniach. Rusztowania wykonane z syntetycznych lub naturalnych materiałów, powinny odzwierciedlać w jak największym stopniu cechy i funkcje naturalnej matrycy, a po spełnieniu swojej funkcji powinny podlegać stopniowej degradacji na rzecz naturalnej ECM. Celem sztucznego rusztowania dla komórek i tkanek (ang. scaffold) jest zatem tymczasowe odtworzenie w modelu *in vitro* naturalnej macierzy pozakomórkowej.

5. Materiały wykorzystywane do tworzenia sztucznych rusztowań

Idealny materiał na rusztowanie dla komórek lub tkanek *in vitro* musi charakteryzować się:

- bioresorbowalnością,
- biogodnością,
- znaczną porowatością,
- nietoksycznymi i łatwo usuwalnymi produktami degradacji,
- sprzyjającym środowiskiem do wzrostu i rozwoju komórek,
- odpowiednimi właściwościami mechanicznymi [1, 23].

Do wytwarzania rusztowania wykorzystywane mogą być metale, ceramika oraz naturalne i syntetyczne polimery, które obecnie są najczęściej stosowane.

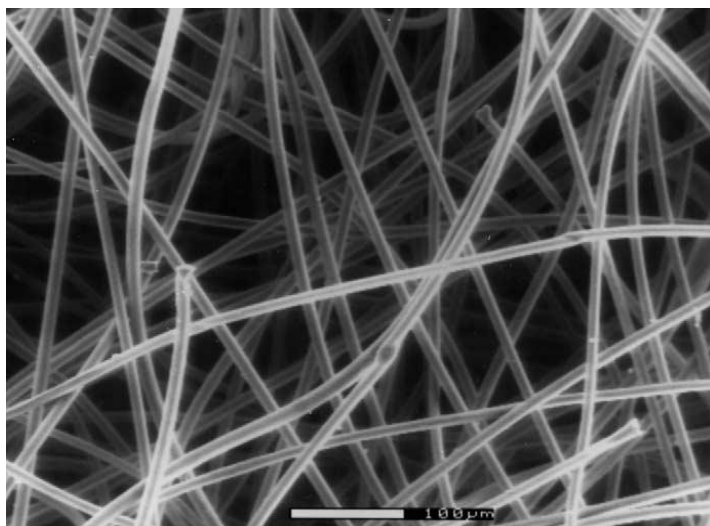
5.1. Syntetyczne polimery

Syntetyczne polimery podlegające biodegradacji wykorzystywane są z powodzeniem do tworzenia rusztowań dla komórek w hodowlach 3D. Mają tę przewagę nad materiałami pochodzenia naturalnego, iż do pewnego stopnia można regulować ich własności, takie jak przepuszczalność i porowatość, czy czas degradacji, który zależy od grubości zastosowanej w konstrukcję warstwy polimerowej [24, 25, 26]. Polimery te są resorbowalne i charakteryzują się czasem biodegradacji od kilku tygodni do kilku miesięcy. Wykazują znaczną zdolność do tworzenia włókien i są często stosowane jako podłoża matrycy

tkankowych oraz do regeneracji tkanek z uwagi na stosunkowo krótki czas degradacji, korzystne właściwości mechaniczne i biokompatybilność [27, 28].

5.1.1. Poliglikolid (PGA, poly(glycolic acid))

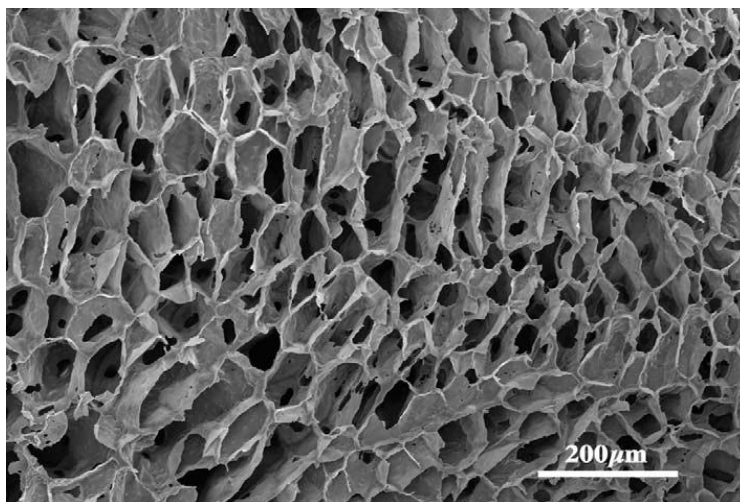
Jest to polimer kwasu glikolowego. Poliglikolid jest materiałem najczęściej wykorzystywanym do tworzenia biodegradowalnych rusztowań komórkowych (Rys. 4.). W warunkach *in vivo* lub w środowisku wodnym szybko ulega degradacji (w ciągu 2 – 4 tygodni) [29]. PGA stosuje się w postaciach mikro- i nano- trójwymiarowych podłoży, ponieważ komórki wykazują dobrą adhezję do PGA i materiał ten nie zakłóca ich wzrostu i namnażania [30].



Rys. 4. Rusztowanie z PGA – widok ze skaningowego mikroskopu elektronowego SEM [29]

5.1.2. Polilaktyd (PLA, poly(lactic acid))

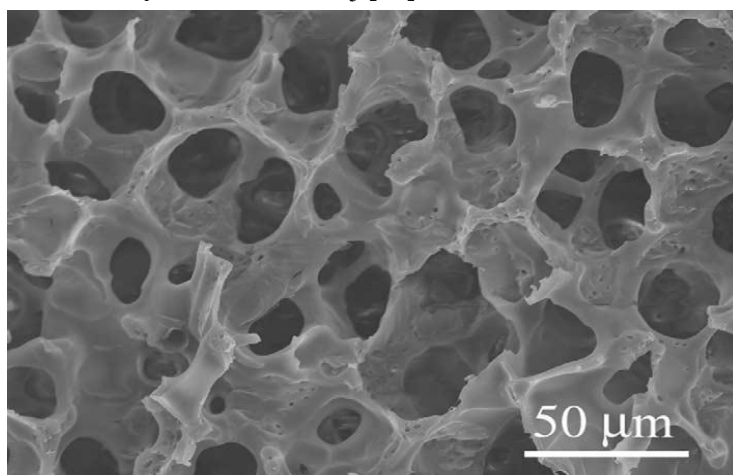
Polilaktyd jest polimerem kwasu mlekowego, posiada dodatkową grupę metylową, co nadaje mu bardziej hydrofobowy charakter w porównaniu do PGA. Nieco wolniej też degraduje [29].



Rys. 5. Rusztowanie z PLA – widok z SEM [29]

5.1.3. PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid))

Jest to polimer kwasu mlekowego i glikolowego. Regulując stężenie monomerów PGA i PLA można wytworzyć kopolimer (polilaktyd/poliglikolid – PLGA), który posiada właściwości pośrednie pomiędzy tymi dwoma rodzajami. PLGA charakteryzuje się biogodnością oraz regulowaną szybkością degradacji łatwo ulega obróbce mechanicznej, co pozwala na wytwarzanie wielu postaci i struktur [28, 29]. Zastosowanie biodegradowalnego PLGA do ukierunkowanej regeneracji tkanek polega na tym, że stanowi on przenikalny materiał zanikający po ukształtowaniu się tkanki docelowej [30].

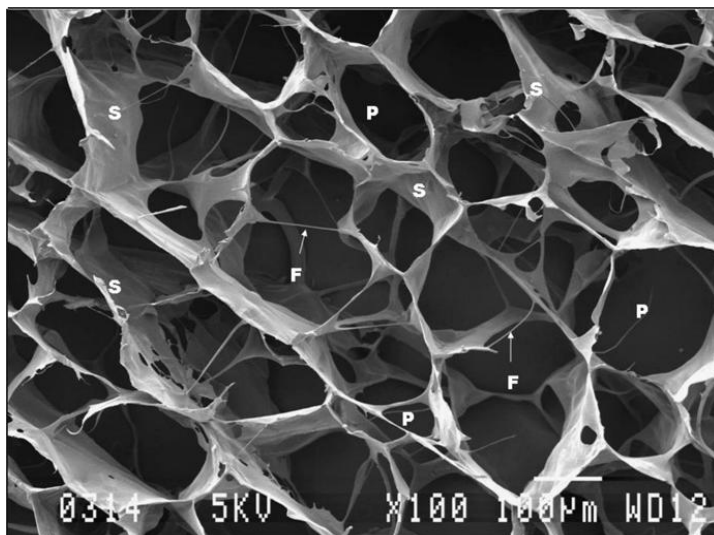


Rys. 6. Rusztowanie z PLGA – widok z SEM [29]

5.2. Naturalne polimery

5.2.1. Kolagen

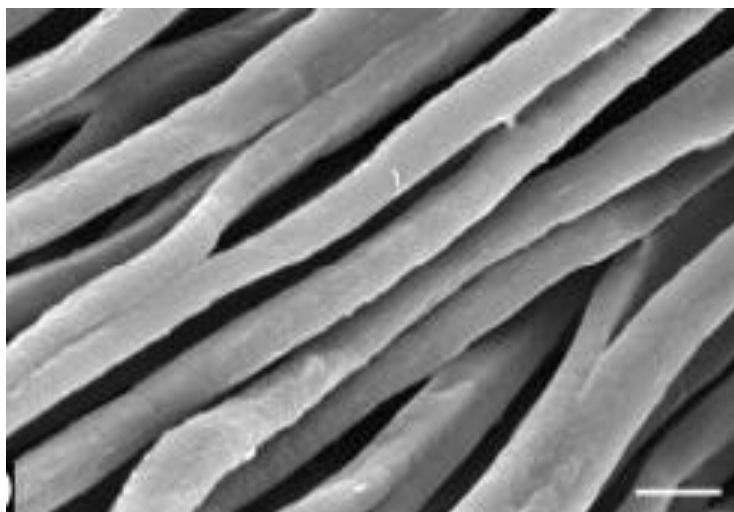
Kolagen jest naturalnym składnikiem ECM, zapewniającym mechaniczną wytrzymałość i odporność tkankom. Był wykorzystywany jako biodegradowalny biomateriał na rusztowania (np. w postaci gąbek) jako jeden z pierwszych naturalnych polimerów w praktyce klinicznej [28]. Wykazuje wysoką biodegradowalność i biogodność w porównaniu z syntetycznymi polimerami. Inną jego zaletą jest zminimalizowanie odczynu zapalnego [31]. Zastosowanie rusztowań z naturalnego kolagenu umożliwia znacznie lepszą adhezję i migrację komórek *in vitro* [32]. Wykorzystywany jest z powodzeniem jako materiał na rusztowania dla skóry, pęcherza moczowego lub nerwów [33]



Rys. 7. Rusztowanie kolagenowe – widok z SEM [34]

5.2.2. Elastyna

Elastyna również jest naturalnym polipeptydem stanowiącym składnik ECM. Nadaje tkankom i narządom odpowiednią elastyczność, w związku z tym znaczne jej ilości znajdują się w skórze, płucach oraz ścianach naczyń krwionośnych. Materiały, które wykorzystują elastynę są coraz bardziej popularne ze względu na potencjalne zastosowanie w hodowlach 3D [35].



Rys. 8. Włókna elastyny – widok z SEM [35]

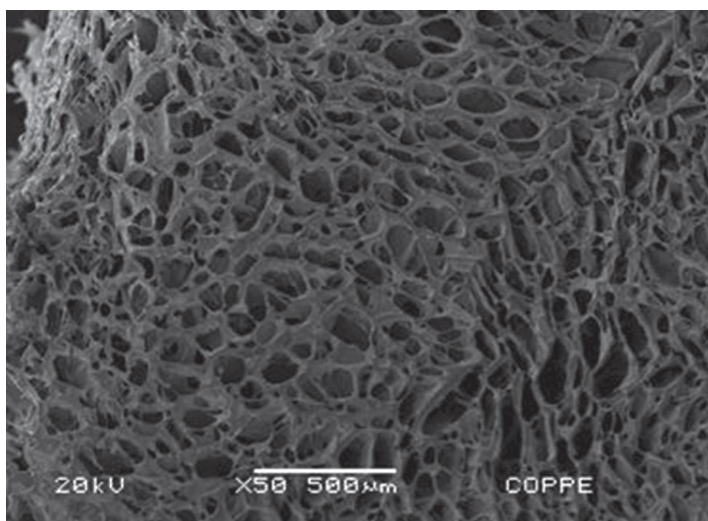
5.2.3. Kwas hialuronowy

Jest kolejnym polimerem naturalnie występującym w skórze człowieka. Jego zadaniem jest regulacja ilości wody hydratacyjnej. Konstruowane są również rusztowania na bazie kwasu hialuronowego, które pęcznieją pod wpływem wody, ale zachowują strukturę mikroporowatą i włóknistą [36, 37].

Udało się otrzymać hybrydowe rusztowania utworzone z kolagenu, elastyny oraz kwasu hialuronowego, które potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie w inżynierii tkankowej. Wykazano, iż rusztowania zbudowane z pochodnych kwasu hialuronowego, wspomagają wzrost chondrocytów *in vitro* [37].

5.2.4. Chitozan

Chitozan jest materiałem naturalnego pochodzenia. Powstaje w wyniku procesu deacetylacji chityny, uzyskiwanej z pancerzyków morskich skorupiaków. Wykazano, że chitozan posiada własności antybakteryjne, hemostatyczne oraz charakteryzuje się znaczną biokompatybilnością [38].



Rys. 9. Rusztowanie z chitozanu – obraz z SEM [39]

5.2.5. Kwas alginowy i jego sole (alginiany)

Kwas alginowy pozyskiwany jest ze ścian komórkowych różnych morskich alg (głównie brunatnic) i trawy morskiej. Nie jest rozpuszczalny w wodzie, ale bardzo dobrze ją wchłania (pęcznieje), dzięki zdolności do absorbowania nawet trzykrotnie więcej wody (wagowo) w stosunku do własnej masy. Po wyodrębnieniu z alg najczęściej przetwarza się go do postaci rozpuszczalnych w wodzie soli sodowych lub bardzo słabo rozpuszczalnych soli wapniowych [28, 40].

6. Podsumowanie

W tradycyjnych kulturach komórkowych czy tkankowych komórki rosną w dwóch wymiarach (2D), pokrywając powierzchnię naczynia hodowlanego pojedynczą (zazwyczaj) warstwą komórek (tzw. monolayer). To z kolei znacząco ogranicza ich wykorzystanie jako wiarygodnego prognostyka reakcji komórkowych i procesów zachodzących w warunkach *in vivo*. Natomiast hodowle przestrzenne (3D) pozwalają na charakterystyczny ukierunkowany układ poszczególnych rodzajów komórek oraz odtworzenie ich otoczenia oraz wzajemnych przestrzennych kontaktów i interakcji między komórkami, co naśladuje funkcjonowanie żywych komórek w tkankach i narządach. Technologia syntetycznych lub naturalnych rusztowań może być potencjalnie wykorzystana w hodowlach ludzkich komórek macierzystych, które znajdują zastosowanie w badaniach nad nowymi lekami. Kolejne zastosowanie to hodowla komórek ludzkiej skóry, które będą używane w testach kosmetyków. Wykorzystanie rusztowań nie jest rzecz jasna jedyną znaną i dostępną

technologią hodowli komórek w 3D. Jednakże inne mają liczne ograniczenia, są skomplikowane i dość kosztowne w użyciu [3].

Niewątpliwie, wykorzystanie tego rodzaju hodowli stanowi znaczący krok w kierunku opracowywania i testowania bardziej skutecznych substancji leczniczych. Dalszy rozwój i udoskonalanie technik hodowli komórek w 3D pozwoli na ich wykorzystanie na znacznie szerszą skalę, zwłaszcza w medycynie regeneracyjnej oraz inżynierii tkankowej.

Literatura

- [1] Stokłosa S., *Hodowla komórek i tkanek*. Warszawa, PWN, 2004
- [2] Butler M., *Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals*, Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, vol. 68, s. 283-291
- [3] *Cell Growth Technology Promises More Successful Drug Development* [online], Wrzesień: 2007 [dostęp 11 lutego 2014] Dostępny w World Wide Web: <https://www.dur.ac.uk/news/newsitem/?itemno=5743>
- [4] Abbott A., *Cell culture: Biology's new dimension*. Nature, 2003, vol. 424, s. 870-872
- [5] Haycock JW., *3D cell culture: a review of current approaches and techniques*. Methods in Molecular Biology, 2011, vol. 695, s. 1-15
- [6] Lee J., Cuddihy MJ., Kotov NA., *Three-Dimensional Cell Culture Matrices: State of the Art*. Tissue Engineering Part B: Reviews, 2008, vol. 14, s. 61-86
- [7] Gregoraszczyk EL. *The advantage of the aggregate culture of isolated ovarian cell types over the monolayer culture*. Cytotechnology, 1990, vol. 4, s. 195-200
- [8] Freshney RJ., *Culture of specific cell types*. [W:] *Culture of Animal Cells*. pod red. Freshney RJ., New York, Wiley-Liss E.L., 1994, s. 335-341
- [9] Khan NA., Shacoori V., Havouis R., i wsp. *Three dimensional culture of pineal cell aggregates: a model of cell-cell co-operation*. Journal of Neuroendocrinology, 1995, vol. 7, s. 353-359.
- [10] Sutherland RM. *Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model*. Science, 1988, vol. 240, s. 177-184
- [11] Wiese C., Cogoli-Greuter M., Argentini M., i wsp., *Metabolism of 5-fluoro-dopa and 6-fluoro-dopa enantiomers in aggregating cell cultures of fetal rat brain*. Biochemical Pharmacology, 1992, vol. 44, s. 99-105
- [12] Sutherland RM., McCredie JA., Inch WR., *Growth of multicell spheroids in tissue cultures as a model of nodular carcinomas*. Journal of the National Cancer Institute, 1971, vol. 46, s. 113-120
- [13] Mueller-Klieser WJ., *Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 1987, vol. 113, s. 101-22
- [14] Pampaloni F., Reynaud EG., Stelzer EHK., *The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007, vol. 8, s. 839-845
- [15] Phung YT., Barbone D., Broaddus VC., i wsp. *Rapid Generation of In Vitro Multicellular Spheroids for the Study of Monoclonal Antibody Therapy*. Journal of Cancer, 2011, vol. 2, s. 507-514

- [16] Stark H-J., Szabowski A., Fusenig NE., i wsp. *Organotypic cocultures as skin equivalents: A complex and sophisticated in vitro system*. Biological Procedures Online, 2004, vol. 6, s. 55-60
- [17] *Schematic illustration of the organotypic culture system [online]*, 2004, [dostęp 10 lutego 2014], Dostępny w World Wide Web: http://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=389904_bpo_v6_p55_m72f1lg&eq=4
- [18] Frantz C., Stewart KM., Weaver VM., *The extracellular matrix at a glance*. Journal of Cell Science, 2010, vol. 123, s. 4195-4200
- [19] Lukashev ME., Werb Z., *ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour*. Trends in Cell Biology, 1998, vol. 8, s. 437-441
- [20] Lu P., Weaver VM., Werb Z., *The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression*. The Journal of Cell Biology, 2012, vol. 196, 395-406
- [21] Langer R., Vacanti JP., *Tissue engineering*. Science, 1993, vol. 260, s. 920-926
- [22] Tabata Y., *Recent progress in tissue engineering*. Drug Discovery Today, 2001, vol. 6, s. 483-487
- [23] Bokhari M., Carnachan RJ., Cameron NR., i wsp., *Culture of HepG2 liver cells on three dimensional polystyrene scaffolds enhances cell structure and function during toxicological challenge*. Journal of Anatomy, 2007, vol. 211, s. 567-576
- [24] Ichichara S., Inada Y., Nakamura T., *Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts*. Injury, 2008, vol. 39, suppl. 4, s. S29-S39
- [25] Johnson E O., Soucacos PN., *Nerve repair: experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides*. Injury, 2008, vol. 39, suppl. 3, s. S30-S36
- [26] Jiang X., Lim SH., Mao HQ., i wsp., *Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits*. Experimental Neurology, 2009, vol. 223, s. 86-101
- [27] Vleggeert-Lankamp LAM., Ruiters GCW., Wolfs JFC., i wsp., *Pores in synthetic nerve conduits are beneficial to regeneration*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007, vol. 80, s. 965-982
- [28] Martowicz M., Laska J., *Biomateriały polimerowe w regeneracji ubytków skóry*. Inżynieria Biomateriałów, 2010, vol. 95, s. 2-9
- [29] Ma PX., *Scaffold for tissue fabrication*. Materials Today, 2004, vol. 7, s. 30-40
- [30] Holy CE., Cheng C., Davies JE., i wsp., *Optimizing the sterilization of PLGA scaffolds for use in tissue engineering*. Biomaterials, 2001, vol. 22, s. 25-31
- [31] Chin CD., Khanna K., Sia SK., *A microfabricated porous collagen-based scaffold as prototype for skin substitutes*. Biomedical Microdevices, 2008, vol. 10, s. 459-467
- [32] Buttafoco L., Kolkman NG., Engbers-Buijtenhuijs P., i wsp., *Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications*. Biomaterials, 2006, vol. 27, s. 724-734
- [33] Faraj KA., VanKuppevelt TH., Daamen WF., *Construction of collage scaffolds that mimic the three-dimensional architecture of specific tissues*. Tissue engineering, 2007, vol. 13, s. 2387-2394
- [34] Wessels QB., Pretorius E., *Enhanced stabilization of collagen-based dermal regeneration scaffolds through the combination of physical and chemical crosslinking*. South African Journal of Science, 2008, vol. 104, s. 513-516
- [35] Daamena WF., Veerkampa JH., van Hestb JCM., i wsp., *Elastin as a biomaterial for tissue engineering*. Biomaterials, 2007, vol. 28, s. 4378-4398

- [36] Kim TG., Chung HJ., Park TG., *Macroporous and nanofibrous hyaluronic acid/collagen hybrid scaffold fabricated by concurrent electrospinning and deposition/leaching of salt particles*. Acta Biomaterialia, 2008, vol. 4, s. 1611-1619
- [37] Scuderi N., Onesti MG., Bistoni G., i wsp., *The clinical application of autologous bioengineered skin based on a hyaluronic acid scaffold*. Biomaterials, 2008, vol. 29, s. 1620-1629
- [38] Nettles DL., Elder SH., Gilbert JA., *Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering*. Tissue engineering, 2002, vol. 8 s. 1009-1016
- [39] Fernandes LL., Resende CX., Tavares DS., i wsp., *Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering*. Polimeros, 2011, vol. 21, s. 1-6
- [40] Tu J., Bolla S., Barr J., i wsp., *Alginate microparticles prepared by spray-coagulation method: Preparation, drug loading and release characterization*. International Journal of Pharmaceutics, 2005, vol. 303, s. 171-181

Trójwymiarowe hodowle komórkowe – brakujące ogniwo między modelami *in vitro* i *in vivo*?

Streszczenie

Tradycyjne badania *in vitro* wykorzystują dwuwymiarowe (2D) modele, jakimi są kultury komórkowe hodowane w postaci pojedynczej warstwy komórek na plastikowych płytkach, szalkach Petriego lub w butelkach. Jednakże, rosnąca liczba badaczy zaczyna kwestionować użyteczność badań w warunkach tak dalece odmiennych od tych, jakie występują *in vivo*. Pomimo wielu zalet, kultury komórek 2D są stosunkowo prymitywne i nie mogą w pełni odzwierciedlać fizjologii komórek i tkanek, oraz procesów zachodzących w żywych organizmach. Obecnie obserwuje się wzrastające zainteresowanie potencjalnym wykorzystaniem trójwymiarowych (3D) modeli kultur komórkowych w badaniach podstawowych (np. biologia nowotworów), testowaniu nowych leków, inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej. Wykazano, że hodowle komórkowe 3D znacznie lepiej niż modele 2D naśladują cechy, strukturę i środowisko komórek, które występują *in vivo*. Celem niniejszego artykułu jest zaprezentowanie techniki hodowli komórek *in vitro* w modelu 3D, jako swoistego łącznika pomiędzy „płaską” hodowlą komórkową, a złożoną, przestrzenną strukturą żywego organizmu i jego tkanek. Opisano podstawowe rodzaje hodowli przestrzennych oraz udział macierzy pozakomórkowej (ECM) w tworzeniu naturalnego rusztowania dla komórek i tkanek *in vivo*. Przedstawiono także pokrótce najczęściej używane naturalne i syntetyczne materiały, wykorzystywane do wytwarzania sztucznych rusztowań w hodowlach 3D.

Słowa kluczowe: agregaty, sferoidy, hodowle narządowe, kokultury organotypowe

Three-dimensional cell cultures – a missing link between *in vitro* and *in vivo* models?

Abstract

Conventional *in vitro* studies use two-dimensional (2D) cell models, cultured as monolayer in plastic plates, Petri dishes or flasks. However, a growing number of scientists have begun to question the usefulness of studies in conditions which are so far and quite different from those found *in vivo*. Despite many advantages, the 2D cell cultures are relatively primitive and cannot entirely reflect the physiology of cells and tissues, and processes which happen in living organisms. Currently, it is observed an increasing interest in the potential application of three-dimensional (3D) cell cultures in such fields as basic life science research (e.g. cancer biology), new drugs screening, tissue engineering and regenerative medicine. It has been demonstrated that 3D cell cultures mimic the features, structure and environment of cells found *in vivo* much more closely than 2D ones. The aim of this article is to present the technique of 3D cell culture *in vitro*, as a specific link between “flat” cell culture and complex, 3D structure of living organism and its tissues. The basic types of 3D cell cultures and a role of extracellular matrix (ECM) in formation of natural scaffold for cells and tissues *in vivo* have been described. There have also been outlined the most frequently used natural and synthetic materials applied for artificial scaffolds in 3D cultures.

Keywords: aggregates, spheroids, organ cultures, organotypic co-cultures

WPLYW DENDRYMERU PAMAM 3 GENERACJI NA KOMÓRKI WYBRANYCH SZCZEPÓW DROŻDŻY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. Wstęp

1.1. Dendrymery

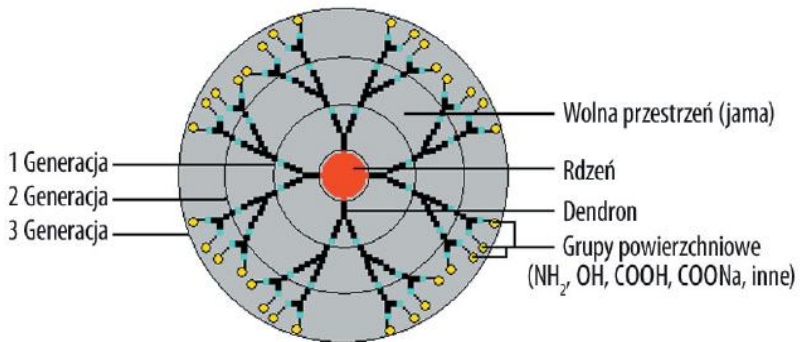
Dendrymery są makromolekułami o ściśle zdefiniowanej strukturze, zsyntetyzowane po raz pierwszy w 1978 roku przez niemieckiego chemika Fritza Vogtla, a następnie niezależnie przez zespół Donalda Tomali i George'a F. Newkome'a. Pod względem chemicznym dendrymery są rozgałęzionymi polimerami, o dużym upakowaniu grup funkcyjnych, tworzącymi kuliste makrocząsteczki. W budowie strukturalnej dendrymerów można wyróżnić wielofunkcyjny rdzeń, od którego promieniście odchodzą ramiona dendrymerów zwane dendronami. Kolejne, powtarzające się motywy tego polimeru określane są mianem generacji (Rys.1) [1].

Ze wzrostem generacji dendrymeru rośnie gęstość upakowania grup funkcyjnych w obszarze powierzchniowym cząsteczki. Przyjmuje się, że dendrymery występują w postaci kulistej dopiero od piątej generacji, natomiast cząsteczki niższych generacji mają zwykle tendencję do tworzenia form otwartych. Konsekwencją wzrostu gęstości upakowania ze wzrostem generacji dendrymeru jest hamowanie dalszego wzrostu cząsteczki, co zwane jest „efektem Starburst” i sprawia, że dendrymery mogą być syntetyzowane jedynie do generacji 10 [1, 2].

Na końcu dendronów znajdują się wolne grupy funkcyjne, które mogą być zmieniane przez różnego rodzaju podstawniki modyfikujące właściwości chemiczne i fizyczne cząsteczki dendrymeru. Modyfikacjom sprzyja też obecność w ich cząsteczkach wolnych przestrzeni, tzw. jam, w których można umieścić mniejsze cząsteczki (np. leki). Mówi się wtedy o oddziaływaniach typu „gość- gospodarz” [1, 2, 3].

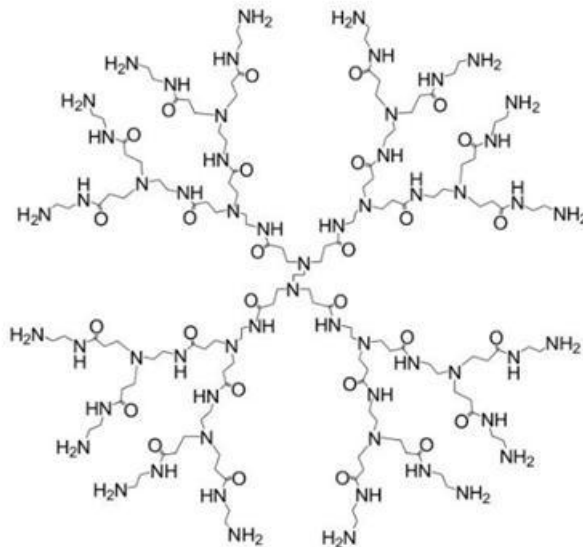
¹ bmkate@wp.pl, Koło Naukowe Chemików „Koronan”, Uniwersytet Opolski, Wydział Chemii, www.chemia.uni.opole.pl

² kjoncz@gmail.com, Uniwersytet Opolski, Wydział Chemii, www.chemia.uni.opole.pl

Rys. 1. Budowa dendrymeru^[2]

1.2. Dendrymery PAMAM

Dendrymery z rodziny poli(amidoaminowych) PAMAM konstruowane są na bazie amoniaku bądź etylenodiaminy. Każda cząsteczka dendrymeru posiada przyłączone do rdzenia, trzy bądź cztery powtarzające się jednostki (Rys. 2.). Każda z takich jednostek posiada dwa miejsca, do których przyłączone mogą zostać następne jednostki, bądź też grupy końcowe, wybrane zgodnie z oczekiwanymi właściwościami. Ze względu na podobieństwo w budowie białek występujących w organizmie ludzkim, nazywane są czasami sztucznymi proteinami [4].



Rys. 2. Dendrymer PAMAM generacji 3 [5]

1.3. Zastosowanie dendrymerów w medycynie

Unikalne właściwości dendrymerów sprawiają, że mogą być one wykorzystane jako nośniki niskocząsteczkowych substancji farmakologicznych. Cząsteczki leku mogą zostać związane na powierzchni poprzez przyłączenie do grup powierzchniowych, bądź też inkapsulowane w jamach dendrymeru. Przykładowo, pochodne dendrymerów PAMAM oraz PPI mogą znaleźć zastosowanie jako transportery genów w terapii genowej, natomiast dendrymery MAP (Multiple Antigenic Peptide) są obecnie badane pod kątem zastosowania w szczepionkach przeciwko malarii. Innym interesującym przykładem jest przeznaczony dla kobiet preparat VivaGel, który zapobiega zakażeniom wirusem HIV drogą płciową [1, 2, 3].

Dendrymery mogą znaleźć zastosowanie również w obrazowaniu klinicznym. Przykładowo Gadomer-17-dendrymer lizynowy, posiadający na powierzchni jony gadolinu(III) może zostać użyty jako kontrast w badaniach NMR. Dzięki tej technice można zobrazować choroby nerek oraz choroby układu krwionośnego. Badania wykazują też, że możliwe jest syntetyzowanie dendrymerów o różnej budowie i różnej masie cząsteczkowej, w celu uzyskania lepszego obrazowania konkretnego narządu lub układu, np. dendrymery hydrofilowe, o większej masie cząsteczkowej, mają lepsze zastosowanie w badaniu układu krwionośnego, hydrofobowe, w badaniu wątroby [2, 6].

Dendrymery znalazły zastosowanie również w tomografii komputerowej. Przykładem może być powstała na bazie dendrymeru PAMAM generacji 4, cząsteczka G-4-(DMAA-IPA)₃₇, o dużej procentowej zawartości jodu (33%). Obraz uzyskany przy użyciu tego związku, w porównaniu z zastosowaniem małych cząsteczek jodu, charakteryzuje się wysoką rozdzielczością przestrzenną. Dodatkowo, dłuższy jest też czas krążenia tego czynnika kontrastującego, co pozwala na wydłużenie skali czasu obrazowania i potencjalne zmniejszenie toksyczności, jaka towarzyszyłaby iniekcji kolejnej dawki małych cząsteczek jodu [2].

Jednym z najważniejszych przykładów zastosowania dendrymerów jako nośnika leków są terapie przeciwnowotworowe. Tradycyjne terapie borykają się z licznymi problemami, takimi jak mała efektywność, będąca konsekwencją ograniczonej rozpuszczalności chemioterapeutyków oraz słaba specyficzność, wskutek której uszkodzeniu ulegają nie tylko komórki nowotworowe, lecz także tkanki prawidłowe^[7]. Ostatnimi laty prowadzono intensywne badania nad możliwością wykorzystania dendrymerów jako nośników leków przeciwnowotworowych. Zastosowanie dendrymeru PAMAM o grupach powierzchniowych zastępowanych przez reszty poli(tlenku etylenu) (PEOX) umożliwiło kontrolowane uwalnianie leków przeciwnowotworowych takich jak 5-fluorouracyl, doxorubicyna, methotrexat. Dobre wyniki uzyskano również wykorzystując dendrymer PAMAM jako nośnik innego leku przeciwnowotworowego – kamptotecyny. Uzyskano wtedy lepszą rozpuszczalność

związku, wyższe stężenie w komórkach nowotworowych oraz dłuższy czas retencji^[6]. Stwierdzono też, że chemioterapie z wykorzystaniem modyfikowanych dendrymerów jako nośnika methotrexatu, targetowanych kwasem foliowym, będącym ligandem rozpoznawanym przez komórki nowotworowe, cechują się spadkiem toksyczności hemolitycznej w porównaniu do terapii z zastosowaniem wolnego leku [8].

1.4. Wpływ dendrymerów PAMAM na komórki

Najczęściej wykorzystywane w badaniach dendrymery z rodziny PAMAM mają charakter kationowy. Molekuły o takim charakterze wykazują pewną cytotoksyczność, wywołaną destabilizacją błon komórkowych. Ta cytotoksyczność tłumaczona jest silnymi oddziaływaniami między ujemnie naładowanymi membranami komórkowymi, a dodatnio naładowanymi grupami powierzchniowymi dendrymeru. W celu zmniejszenia tego efektu możliwa jest częściowa modyfikacja aminowych grup powierzchniowych za pomocą jednostek obojętnych, takich jak glikol polietylenowy (PEG) bądź kwasy tłuszczowe. Należy jednak zaznaczyć, że wprowadzenie zbyt dużej liczby takich jednostek nie obniża już cytotoksyczności, gdyż występują wówczas oddziaływania hydrofobowe, które również prowadzą do rozkładu komórek. Najmniejszą cytotoksyczność uzyskuje się w przypadku dendrymerów PAMAM do 4 generacji, o grupach powierzchniowych częściowo zabezpieczonych przy użyciu PEG [1, 3, 9].

Obecnie coraz częściej w badaniach wykorzystuje się dendrymery PAMAM o zmodyfikowanej powierzchni również w celu uzyskania odpowiedniej odpowiedzi biologicznej, np. pokrywając powierzchnię cząsteczek dendrymerów ligandami rozpoznawanymi przez komórki nowotworowe [6,8].

2. Cel pracy

Celem pracy było zbadanie cytotoksyczności dendrymeru PAMAM generacji 3 wobec komórek *Saccharomyces cerevisiae* szczepów *F87-24B* oraz *D273-10B*. Część eksperymentalna obejmowała: określenie minimalnego stężenia dendrymeru hamującego wzrost komórek (MIC) oraz określenie poziomu ekspresji genów wybranych transporterów błonowych.

3. Materiały i metody

3.1. Wyznaczanie minimalnego stężenia hamującego wzrost (MIC)

W badaniach wykorzystano następujące szczepy *Saccharomyces cerevisiae*: *D273-10B MAT α met⁻* i *F87-24B MAT α his⁻*, pochodzące z kolekcji szczepów Katedry Biotechnologii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Opolskiego.

Komórki szczepów *S. cerevisiae* hodowano na podłożach YPG (2% pepton, 1% ekstrakt drożdżowy, 2% glukoza) oraz YNB (6,7% Yeast Nitrogen Base, 2% glukoza). Podłoże YNB wzbogacano aminokwasami zgodnie z indywidualnym zapotrzebowaniem danego szczepu.

W badaniach wykorzystano 20% roztwór dendrymeru PAMAM G3 w metanolu (Aldrich®).

Minimalne stężenie dendrymeru hamujące wzrost (MIC) *S. cerevisiae* D273-10B oraz F87-24B wyznaczano na podstawie hodowli komórek w podłożu YNB oraz YPG, zawierającym różne stężenia badanego związku, a następnie posiewu na płytkę z podłożem stałym YPG.

3.2. Badanie ekspresji genów

Z hodowli szczepu na podłożu YPG (kontrola) i YPG z dodatkiem dendrymeru o stężeniu 10 µg/ml, po czasie inkubacji odpowiednio: 48 h oraz 48 h i 72 h, wyizolowano RNA całkowite. Izolację RNA przeprowadzono przy użyciu zestawu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit, firmy EURx, zgodnie z zaleceniami producenta. Na jego matrycy dokonano syntezy cDNA, przy użyciu zestawu SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), według zaleceń producenta. Otrzymane cDNA użyto do reakcji multiplex-PCR, w której namnażano fragmenty genów wybranych transporterów błonowych. W reakcji tej użyto następujące startery:

Startery F (wiodące) dla genów:

- *PDA1*- sekwencja: 5'-TCGTGTTTTGCTGTGAGAAC-3'
- *PDR5*- sekwencja: 5'-TCCAGCGATAGGAAAATGCT-3'
- *PDR1*- sekwencja: 5'-ATGCGAGGCTTGACACCTAA-3'
- Startery R (wsteczne) dla genów:
- *PDA1*- sekwencja: 5'-TAGCAAACCTGGATGCTTGG-3'
- *PDR5*- sekwencja: 5'-CCATTGACCAAGATATCACCA-3'
- *PDR1*- sekwencja: 5'-CCGTTTCTATTCACATCGTCG-3'

Reakcję amplifikacji prowadzono przez 35 cykli, w następujących warunkach:

- Denaturacja wstępna- przez 3 minuty w 94°C
- Denaturacja- 15 sekund w 94°C
- Hybrydyzacja- 15 sekund w 58°C
- Elongacja- 30 sekund w 72°C
- Elongacja końcowa- 7 minut w 72°C

Produkty reakcji multiplex-PCR zostały poddane elektroforezie w 2% żelu agarozowym.









































4. Wyniki i dyskusja

4.1. MIC na podłożu YNB

W przypadku obu szczepów zaobserwowano początkowo hamujący wpływ dendrymeru na wzrost komórek. W miarę wydłużania czasu inkubacji, w obecności dendrymeru, obserwowano lepszy wzrost komórek.

Szczep D273-10B po 24 godzinach inkubacji wykazywał słaby wzrost. Stwierdzono, że dendrymer o stężeniu 12,5 µg/ml działał hamująco na wzrost komórek. Po wydłużeniu czasu inkubacji do 96 h zaobserwowano ich wzrost nawet przy stężeniu 20 µg/ml (Tab.1).

Tab.1. Wzrost szczepu D273-10B na podłożu YPG, po uprzedniej inkubacji na płynnym podłożu YNB z dodatkiem dendrymeru o określonym stężeniu.

Szczep D273-10B								
Wzrost na podłożu YPG po inkubacji w podłożu YNB								
t [h]	K	K _z metanolem	z dodatkiem dendrymeru PAMAM o stężeniu (µg/ml)					
			7,5	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0
24								
48								
72								
96								
120								

Oznaczenia: t – czas hodowli; K- kontrola; K_{z metanolem} – kontrola z dodatkiem metanolu

W przypadku szczepu F87-24B po 24 h inkubacji obserwowano bardzo silny hamujący wpływ dendrymeru na wzrost komórek. Już stężenie na poziomie 10,0 µg/ml było letalne dla komórek tego szczepu. Po wydłużeniu czasu inkubacji do 96 h, zaobserwowano wzrost komórek w obecności dendrymeru o stężeniu 17,5 µg/ml (Tab.2).

Zaobserwowany w obu przypadkach wzrost przeżywalności komórek badanych szczepów, przy wydłużonym czasie inkubacji w obecności dendrymeru, może sugerować uruchomienie mechanizmu oporności, polegającym na wyrzucaniu szkodliwego związku na zewnątrz komórek.

Tab.2. Wzrost szczepu F87-24B na podłożu YPG, po uprzedniej inkubacji na płynnym podłożu YNB z dodatkiem dendrymeru o określonym stężeniu.

Szczep F87-24B								
Wzrost na podłożu YPG po inkubacji w podłożu YNB								
t [h]	K	K _z metanolem	z dodatkiem dendrymeru PAMAM o stężeniu (µg/ml)					
			7,5	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0
24								
48								
72								
96								
120								

Oznaczenia: t- czas hodowli; K- kontrola; Kmet.- kontrola z dodatkiem metanolu

4.2. MIC na podłożu YPG

W przypadku obu szczepów *Saccharomyces cerevisiae* zauważono różnice we wzroście komórek w zależności od podłoża.

W przypadku szczepu D273-10B, największy wzrost komórek obserwowano po 120 godzinach inkubacji w obecności dendrymeru. Im krótszy czas inkubacji tym słabszy wzrost komórek przy wyższych stężeniach dendrymeru (Tab.3).

Również w przypadku szczepu F87-24B widoczny jest hamujący efekt działania dendrymeru niezależnie od stężenia i czasu inkubacji (Tab.4).

Tab.3. Wzrost szczepu D273-10B na podłożu YPG, po uprzedniej inkubacji na płynnym podłożu YPG z dodatkiem dendrymeru o określonym stężeniu.

Szczep D273-10B							
Wzrost na podłożu YPG po inkubacji w podłożu YPG							
t [h]	K	K _z metanolem	z dodatkiem dendrymeru PAMAM o stężeniu (μg/ml)				
			10,0	15,0	20,0	40,0	50
48							
72							
96							
120							

Oznaczenia: t – czas hodowli; K – kontrola; K_{z metanolem} – kontrola z dodatkiem metanolu

Tab.4. Wzrost szczepu F87-24B na podłożu YPG, po uprzedniej inkubacji na płynnym podłożu YPG z dodatkiem dendrymeru o określonym stężeniu.

Szczep F87-24B							
Wzrost na podłożu YPG po inkubacji w podłożu YPG							
t [h]	K	K _z metanolem	z dodatkiem dendrymeru PAMAM o stężeniu (μg/ml)				
			10,0	15,0	20,0	40,0	50
48							
72							
96							
120							

Oznaczenia: t – czas hodowli; K – kontrola; K_{z metanolem} – kontrola z dodatkiem metanolu

Mimo, iż wyniki otrzymane na tym podłożu są mniej jednoznaczne, to jednak i w tym przypadku podejrzewać można wystąpienie zjawiska wyrzucania toksycznej substancji na zewnątrz komórek, co jest określane mianem efektu efflux. Jedną spośród rodzin białek odpowiedzialnych za wystąpienie tego zjawiska są transportery ABC (ATP-binding cassette). Jest to duża rodzina białek, występująca zarówno u prokariotów, jak i eukariotów. Białka te, mogą być umiejscowione zarówno w błonie komórkowej, wakuolarnej, mitochondrialnej, peroksosomów jak i w cytoplazmie. Główną rolą tych białek jest transport substancji różnego rodzaju: fungicydów, antybiotyków, substancji cytostatycznych i innych ksenobiotyków. Zwykle jest to transport nieswoisty. Substratem dla danej pompy może być wiele związków, co stwarza zagrożenie wystąpienia tzw. oporności wielolekowej, MDR (multi-drug resistance)^[10].

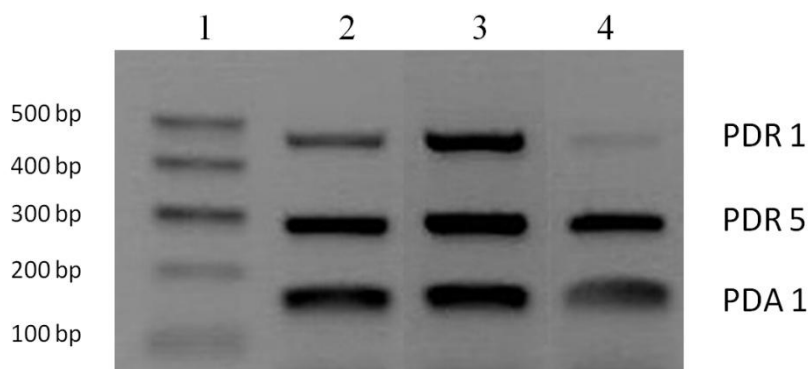
4.3. Badanie ekspresji genów *PDA1*, *PDR1* oraz *PDR5*

Wyniki otrzymane podczas określania MIC sugerują zachodzenie efektu efflux. Jednym z białek odpowiedzialnych za wystąpienie tego zjawiska u drożdży jest Pdr5p, stanowiące pompę zależną od ATP. W ostatnim etapie doświadczeń badano ekspresję genów odpowiedzialnych za powstawanie białka Pdr5p: *PDR5* oraz *PDR1*. Gen *PDR5*, zlokalizowany na chromosomie XV, koduje badane białko, natomiast gen *PDR1* (chromosom VII) koduje czynnik transkrypcyjny Pdr1p, który odpowiada za kontrolę ekspresji genu *PDR5*. Jako kontrolę zastosowano gen *PDA1* (chromosom V), stanowiący gen metabolizmu podstawowego, na którego matrycy powstaje białko E1- podjednostka dehydrogenazy pirogronianowej. Poprzez porównanie aktywności genu *PDA1* z aktywnością *PDR1* i *PDR5*, można było określić, czy któryś z nich ulega ekspresji oraz w jakim stopniu. Do badań molekularnych wybrano szczep F87-24B, ponieważ hamujące wzrost działanie dendrymeru na komórki tego szczepu było silniejsze.

Badania molekularne obejmowały izolację RNA z komórek hodowanych w podłożu YPG (kontrola) i YPG z dodatkiem dendrymeru o stężeniu 10 µg/ml, syntezę cDNA i multiplex-PCR. Produkty reakcji multiplex-PCR poddano elektroforezie w 2% żelu agarozowym.

Z analizy żelu (Rys.3) wynika, że szczep F87-24B wykazuje niewielką nadekspresję genu *PDR5* w stosunku do *PDA1* oraz wyraźnie obniżoną ekspresję genu *PDR1*. Natomiast po 48 h inkubacji szczepu w obecności dendrymeru obserwuje się wyraźny wzrost ekspresji genu *PDR1*. Ekspresja ta rośnie wraz z wydłużeniem hodowli do 72 h.

Wzrost poziomu ekspresji genu *PDR5* nie jest dobrze widoczny na podstawie elektroforezy. Należy jednak podkreślić, że czynnik transkrypcyjny Pdr1p reguluje- wraz z czynnikiem Pdr3p- ekspresję nie tylko genu *PDR5*, lecz także genów takich jak: *PDR10*, *PDR15*, *SNQ2*, *YOR1*, również odpowiadających za powstawanie i prawidłowe działanie pomp efflux. Istnieje więc prawdopodobieństwo, iż zaobserwowany wzrost przeżywalności spowodowany jest zwiększoną ekspresją białek transportujących innych niż badane Pdr5p.



Rys.3. Elektroforeza produktów reakcji multiplex-PCR

Ścieżka 1 – Marker masy (100-500 bp);

Ścieżka 2 – szczep F 87-24B inkubowany 48 h w podłożu YPG z dodatkiem dendrymeru w stężeniu 10 µg/ml;

Ścieżka 3 - szczep F87-24B inkubowany 72 h w podłożu YPG z dodatkiem dendrymeru w stężeniu 10 µg/ml;

Ścieżka 4 - szczep F87-24B inkubowany 48 h w podłożu YPG bez dendrymeru

Wyniki badań ekspresji genów potwierdzają więc przypuszczenia oparte na wynikach otrzymanych w poprzednich punktach pracy- bardzo prawdopodobne jest, że komórki uruchamiają mechanizm lekooporności w postaci pomp efflux, które pozwalają na wyrzucenie dendrymeru na zewnątrz komórki. Nie można natomiast jednoznacznie stwierdzić, które spośród znanych białek MDR są za to odpowiedzialne. Stopniowy wzrost ekspresji genu PDR1 potwierdza również, że proces nabywania lekooporności jest rozciągany w czasie.

5. Wnioski

Dendrymery PAMAM 3 generacji wykazują działanie hamujące wzrost *Saccharomyces cerevisiae* szczepów F87-24B oraz D273-10B.

Hamujące wzrost działanie dendrymeru maleje ze wzrostem czasu inkubacji komórek z tym związkim. Prawdopodobnie spowodowane jest to przez wykształcenie się u komórek mechanizmu lekooporności w postaci pomp Efflu, a nie tylko pompy Pdr5p.

By wykształcić mechanizm lekooporności, komórki potrzebują odpowiednio długiego czasu inkubacji z danym związkiem.

Wykształcenie się mechanizmu lekooporności wobec dendrymeru PAMAM lepiej widoczne jest przy zastosowaniu podłoża YNB niż podłoża YPG.

Literatura

- [1] Schroeder G., *Wybrane aspekty chemii supramolekularnej*, BETAGRAF P.U.H., Poznań 2009.
- [2] Sękowski Sz., Miłowska K., Gabryelak T., *Dendrymery w naukach biomedycznych nanotechnologii*. Postepy Hig Med Dosw. (online). 2008, 62, 725-733, e-ISSN 1732-2693.
- [3] Urbańczyk-Lipkowska Z., *Dendrymery w naukach biomedycznych*. Gazeta farmaceutyczna. 2008, 11, 34-36.
- [4] Kołodziej B., *Synteza i badanie struktury iminowych podandów, kryptandów, dendrymerów oraz wybranych podatów i kryptandów o potencjalnym zastosowaniu w medycynie i nanotechnologii*. Szczecin, 2008.
- [5] Nakhband A., Barar J., *Impacts of Nanomedicines in Ocular Pharmacotherapy*. Bioimpacts. 2011, 1, 7-22.
- [6] Polcyn P., Janiszewska J., Lipkowski A., Urbańczyk-Lipkowska Z., *Synteza, metody identyfikacji i wybrane medyczne zastosowania dendrymerów*. Polimery. 2009, 54, 6, 407-417.
- [7] Werengowska K. M., Wiśniewski M, Terzyk A. P., Gurtowska N., Drewa T. A., Olkowska J., *Chemiczne aspekty celowanej terapii przeciwnowotworowej. II. Połączenia nośnik-lek*. Wiadomości Chemiczne. 2012, 66, 7-8.
- [8] Baker JR Jr., *Dendrimer-based nanoparticles for cancer therapy*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009, 708-19.
- [9] Jain, K., Kersharwani, P., Gupta, U., Jain, N.K., *Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge*. Int. Journ. Pharm. 2010, 394, 122-142.
- [10] Piecuch A., Obląk E., *Mechanizmy oporności drożdży na stres środowiskowy*. Postepy Hig Med Dosw. 2013, 67, 238-254

Wpływ dendrymeru PAMAM 3 generacji na komórki wybranych szczepów drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Streszczenie

Obecnie w medycynie rozpatrywana jest kwestia przenoszenia leków przeciwnowotworowych przez różne związki chemiczne (tzw. terapia celowana). W tym celu należy zbadać czy potencjalne nośniki nie powodują cytotoksycznego efektu na komórki rakowe i zdrowe komórki organizmu, a także- czy nie powoduje wystąpienia efektu MDR. W pracy badano cytotoksyczny wpływ dendrymerów PAMAM 3 generacji na modelowe organizmy – *Saccharomyces cerevisiae*, szczepów D273-10B i F87-24B. Dendrymer PAMAM 3G jest polimerycznym związkiem o kulistym kształcie, mającym zdolność reagowania z innymi związkami (np. lekami), za pośrednictwem grup końcowych. Pierwszym etapem było wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego wzrost komórek (MIC) na podłożach YPG i YNB. Drugi etap obejmował badanie ekspresji genów PDR1 oraz PDR5, które są odpowiedzialne za występowanie efektu efflux. Na podstawie MIC można potwierdzić cytotoksyczny wpływ dendrymeru PAMAM 3G na komórki *Saccharomyces cerevisiae* D273-10B. Jednocześnie analizując wzrost na punktowych posiewach na płytkach z podłożem YNB oraz YPG można podejrzewać, że komórki po pewnym czasie inkubacji wytworzyły obronny mechanizm przeciwko wprowadzonemu związkowi. Możliwe, iż stopniowo wytworzyły one proces wyrzucania na zewnątrz związku tzw. efflux.

Słowa kluczowe: dendrymery PAMAM, efekt efflux

Effect of the 3rd generation PAMAM dendrimer on selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells

Abstract

The problem of the transfer of anticancer drugs by various chemical compounds (*i.e.* targeted therapy) is currently discussed in medicine. For this purpose, it must be verified whether the potential drug-carriers do not cause cytotoxic effects on both the tumor and healthy cells, and if they do not produce a MDR effect, as well. In this work, the cytotoxic effect of the 3rd generation PAMAM dendrimer was studied using a model organism *Saccharomyces cerevisiae* strain D273-10B and F87-24B. The PAMAM 3G dendrimer is a polymeric compound of spherical shape, showing the potential to interact with other chemicals (*e.g.* drugs) through its peripheral functional groups. In the first step, the minimum dendrimer concentration inhibiting the cell growth on the YPG and YNB media was determined. The second step included a study on expression of PDR1 and PDR5 genes, which are responsible for prompting of the efflux effect. Based on the MIC one may confirm the cytotoxic effect of the PAMAM 3G dendrimer in the cells of *Saccharomyces cerevisiae* D273-10B. However, analyzing the cell growth in the point cultures on plates with the YNB and YPG media one may suspect the cells to have developed some defensive mechanism against the introduced toxic substance after certain period of incubation. Probably due to this mechanism, the dendrimers have been gradually expelled outwards the cell (*efflux effect*).

Keywords: PAMAM dendrimers, efflux effect

ZAWARTOŚĆ KWASU KYNURENINOWEGO W PREPARATACH ZIOŁOWYCH POPRAWIAJĄCYCH PAMIĘĆ

1. Wstęp

Poprawianie zdolności intelektualnych i pamięci jest pragnieniem człowieka od zarania dziejów. Na przestrzeni wieków wyselekcjonowano wiele ziół, których składniki wpływają na lepszą koncentrację, poprawiają pracę mózgu, a także niwelują zmęczenie psychiczne. Współcześnie przemysł farmaceutyczno-zielarski oferuje dużą ilość gotowych preparatów ziołowych i suplementów diety „poprawiających pamięć”, po które chętnie sięgają nie tylko osoby starsze, ale także studenci i młodszy uczniowie.

Najpopularniejsze wśród nich to preparaty zawierające miłorząb japoński i żeń-szeń [1,2]. Ponadto takie właściwości przypisuje się rozmarynowi, kozieradce, głógowi i mięcie.

We wcześniejszych badaniach dowiedziono, że jednym ze składników ziół jest kwas kynureninowy (KYNA) [3,4]. Został on po raz pierwszy wykryty w XIX wieku, przez Liebiga, w moczu psa [5]. Jednak przez wiele lat nie cieszył się zainteresowaniem naukowców i był uważany jedynie za produkt uboczny przemiany tryptofanu bez znaczącego działania na organizm kręgowców. Dopiero pod koniec XX wieku stwierdzono, że jest syntetyzowany w mózgu, przede wszystkim przez astrocyty [6]. Wykazano, że w mózgu ma silne działanie farmakologiczne. Jest on antagonistą jonotropowych receptorów glutaminianergicznych oraz nikotynowego receptora $\alpha 7$ [7,8]. Oba te receptory odgrywają znaczącą rolę w neuroprzekaznictwie i plastyczności mózgu. Istnieją doniesienia naukowe sugerujące, że KYNA ma niekorzystny wpływ na procesy uczenia się i pamięci [9,10].

W związku z tym celem pracy było oznaczenie zawartości KYNA w popularnych suplementach diety i ziołach „poprawiających pamięć”.

¹ turskamk@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski, Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, <http://www.am.lublin.pl/uczelnia/struktura-organizacyjna/szczegoly,102.html>

2. Materiał i metody

Zbadano 10 suplementów diety i ziół, którym przypisuje się korzystny wpływ na koncentrację i procesy pamięciowe: Active zen-szeń Multi Tabs (Ferrosan A/S, Soeborg, Dania); Głóg tabletki (**Zakłady Farmaceutyczne COLFARM S.A., Mielec, Polska**); Kwiatostan głogu (Zakład Konfekcjonowania Ziół Flos Elżbieta i Jan Gołąb, Mokrsko, Polska); Owoc głogu („KAWON – HURT” Nowak sp.j., Gostyń, Polska); Nasiona kozieradki („KAWON – HURT” Nowak sp.j., Gostyń, Polska); MB-Active (UNIPHAR Sp. z o.o., Warszawa, Polska); Melisa (**Zakłady Farmaceutyczne COLFARM S.A., Mielec, Polska**); Liść mięty pieprzowej („KAWON – HURT” Nowak sp.j., Gostyń, Polska); Liść miłorzębu (Casablanca, **Długoleka, Polska**); Liść rozmarynu („KAWON – HURT” Nowak sp.j., Gostyń, Polska). Tabletki rozdrobniono, a następnie dodano do nich wodę destylowaną w ilości 5:1 (objętość/masa) i poddano homogenizacji przy użyciu ultradźwięków. Zioła sypkie przygotowano zgodnie z zaleceniami producentów.

Sposób przygotowania kozieradki: 3 łyżki mielonych nasion zalano 2 szklankami wody, gotowano przez 5 minut, odstawiono pod przykryciem na 30 minut, przecedzono. Przygotowanie liści rozmarynu: 1 płaską łyżkę (2 g) liści rozmarynu zalano 1 szklanką (250 ml) wrzącej wody, parzono pod przykryciem przez 20 minut, przecedzono. Liść miłorzębu japońskiego: 1 łyżkę rozdrobnionych liści zalano 1 szklanką wrzącej wody; odstawiono na 30 minut, przecedzono. Kwiatostan głogu: 1 torebkę umieszczono w termosie, zalano ½ szklanki wrzącej wody i odstawiono na 20 minut. Owoc głogu: 1 płaską łyżeczkę (2 g) suszonych owoców zalano jedną szklanką (250 ml) wrzącej wody, pozostawiono na 15 minut pod przykryciem, przecedzono. Liść mięty pieprzowej przygotowano w następujący sposób: 1 saszetkę zalano 1 szklanką (250 ml) wrzącej wody, parzono pod przykryciem przez 10 minut.

Badaniu poddano nadsącz z ziół. KYNA izolowano na żywicy jonowymiennej Dowex 50. Oznaczenie ilościowe przeprowadzono za pomocą chromatografii cieczowej (Dionex HPLC system, kolumna ESA catecholamine HR-80, 3 µm, C₁₈ reverse-phase) z detekcją fluorometryczną (wzbudzenie 344 nm; emisja 398 nm). Wyznaczono średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe wartości średniej (SEM). Obliczono zawartość KYNA w suplementach i ziołach oraz oszacowano ilość KYNA w maksymalnej dawce dobowej tych preparatów. Maksymalną dawkę dobową przyjęto według zaleceń producenta.

3. Wyniki

Wykazano obecność KYNA we wszystkich zbadanych próbkach. W ziołach najwyższą zawartość KYNA w przeliczeniu na 1 g stwierdzono w nasionach kozieradki (15,41 μg), kwiatostanie głogu (6,60 μg) i w liściu mięty pieprzowej (6,50 μg). Mniej KYNA wykazano w liściu miłorzębu japońskiego (3,02 μg) i owocu głogu (0,41 μg). Najmniejszą zawartość KYNA stwierdzono w liściu rozmarynu [Tab. 1].

W suplementach ziołowych w postaci tabletek największą ilość KYNA w przeliczeniu na 1 tabletkę zawierały: melisa (9,87 μg) i głóg (1,65 μg), najmniej w Active żeń-szeń (0,09 μg) i MB-Active (0,02 μg) [Tab. 2].

W przeliczeniu na dawkę dobową najwięcej KYNA zawierały nasiona kozieradki (61,6 $\mu\text{g}/\text{dobę}$). Ziołami z dużą zawartością KYNA są także kwiatostan głogu (19,8 $\mu\text{g}/\text{dobę}$) oraz liść mięty pieprzowej (19,5 $\mu\text{g}/\text{dobę}$) [Tab. 1]. Najniższe wartości KYNA oznaczono w suplementie MB-Active (0,05 $\mu\text{g}/\text{dobę}$) oraz Active żeń-szeń Multi Tabs (0,09 $\mu\text{g}/\text{dobę}$) [Tab. 2].

3.1. Tabele

Tabela 1. Zawartość KYNA w preparatach ziołowych

Nazwa preparatu ziołowego	Ilość KYNA [$\mu\text{g}/\text{g}$]	Maksymalna dawka dobową [μg]
Nasiona kozieradki	15,41 \pm 0,81	61,64
Kwiatostan głogu	6,60 \pm 0,44	19,80
Liść mięty pieprzowej	6,50 \pm 0,20	19,50
Liść miłorzębu japońskiego	3,02 \pm 0,17	9,07
Owoc głogu	0,41 \pm 0,03	2,48
Liść rozmarynu	0,06 \pm 0,02	0,11

Zródło: Opracowanie własne

Tabela 2. Zawartość KYNA w suplementach diety w postaci tabletek

Nazwa suplementu diety	Ilość KYNA [$\mu\text{g}/\text{tabl}$]	Maksymalna dawka dobową [μg]
Melisa	9,87 \pm 0,43	8,90
Głóg	1,65 \pm 0,07	1,00
Active żeń-szeń	0,09 \pm 0,01	0,09
MB-Active	0,02 \pm 0,01	0,05

Zródło: Opracowanie własne

4. Omówienie wyników

KYNA jest substancją endogenną powstającą z tryptofanu. Jest on obecny zarówno w mózgu, jak również na obwodzie [11]. Stężenie KYNA w płynie mózgowo-rdzeniowym jest bardzo niskie i waha się między 0,001–0,032 μM [11]. Istnieją doniesienia naukowe sugerujące, że KYNA bierze udział w patogenezie

chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, choroba Huntingtona, padaczka, depresja, czy schizofrenia. Wzrost stężenia KYNA w płynie mózgowo-rdzeniowym obserwuje się u pacjentów z chorobą Alzheimera oraz z zespołem Downa, natomiast w chorobie Huntingtona, schizofrenii i anoreksji wykazano obniżenie poziomu KYNA [12-14]. Na obwodzie KYNA jest agonistą receptora GPR35, który występuje przede wszystkim na komórkach układu odpornościowego oraz w przewodzie pokarmowym [15]. Opisano także działanie antyproliferacyjne, przeciwzapalne oraz zdolność KYNA do przeciwdziałania wpływowi wolnych rodników [16-19].

Za pamięć odpowiedzialnych jest wiele struktur anatomicznych mózgu, m.in. kora mózgu, hipokamp, ciało migdałowate, jądro ogoniaste [20]. Uważa się, że na poziomie molekularnym istotne są zmiany synaptyczne, które oddziałują wzmacniając lub osłabiając wpływ neuronów na siebie w obrębie pętli aktywności mózgowej. Zarówno procesy wzmagające sprawność przewodnictwa synaptycznego LTP (Long-term Potentiation), jak i osłabienie przewodnictwa LTD (Long-term Depression) są uważane za przyczynę zdolności mózgu do odróżniania nowo otrzymanych przez neurony sygnałów i kodowania ich w postaci śladów pamięciowych. Zjawisko LTP jest w decydującym stopniu zależne od aktywacji receptorów glutaminianergicznych dla kwasu N-metylo-D-asparaginowego (NMDA) [21,22]. Ponieważ KYNA jest antagonistą receptorów glutaminianergicznych działającym szczególnie silnie na receptory NMDA [23], może on wpływać na komponenty uczestniczące w powstawaniu procesów pamięci związanych z tym receptorem.

KYNA został wykryty we wszystkich badanych próbkach. Uzyskane wyniki wskazują, że zawartość KYNA w ziołach i suplementach diety poprawiających pamięć jest bardzo zróżnicowana. W zbadanej próbie 10 preparatów różnica między największą i najmniejszą ilością KYNA w dawce dobowej, odpowiednio, nasion kozieradki i preparacie MB-Active, wyniosła ponad 1 000 x. Wszystkie zbadane preparaty podawane są drogą doustną. Wykazano, że KYNA jest łatwo przyswajalny z przewodu pokarmowego [24]. Dlatego należy zakładać, że KYNA zawarty w suplementach i ziołach „poprawiających pamięć” może zostać wchłonięty z przewodu pokarmowego. Dyskusyjna pozostaje kwestia przenikania KYNA z krwi do mózgu. Istnieją dane wskazujące na to, że KYNA nie przenika przez barierę krew-mózg lub może to czynić w bardzo ograniczonym zakresie [25,26]. Z drugiej strony są publikacje, które wskazują na występowanie działania ośrodkowego po obwodowym podaniu KYNA [27]. Należy podkreślić, że zawartość KYNA stwierdzona w nasionach kozieradki w porównaniu z innymi ziołami jest bardzo wysoka. Wśród dotychczas opisanych ziół największe stężenie wykazano w liściu mięty, brzozy i pokrzywy [11]. Gdyby KYNA dobrze przenikał do ośrodkowego układu nerwowego (OUN), to należałoby oczekiwać hamującego działania tej substancji poprzez receptory glutaminianergiczne NMDA. Należałoby również oczekiwać zahamowania procesów uczenia się i zapamiętywania. Tymczasem tradycyjne

zastosowanie oparte na wieloletniej obserwacji wskazuje, że kozieradka wpływa odwrotnie, korzystnie, na procesy pamięci i myślenia. W związku z tym wydaje się, że KYNA zawarty w preparatach poprawiających pamięć nie przenika do mózgu w wystarczająco dużej ilości.

Należy rozważyć także inną możliwość oddziaływania KYNA na procesy zachodzące w OUN. Opisano, że poza działaniem na receptory glutamianergiczne, wpływa także na receptory GPR35 [15]. Receptory te występują przede wszystkim na komórkach układu odpornościowego oraz w przewodzie pokarmowym. Najnowsze prace naukowe pokazują, że KYNA ma działanie przeciwwrzodowe, przeciwzapalne i łagodzi nadmierne skurcze jelit [16, 28, 29]. Ponadto stwierdzono, że ma działanie immunomodulujące [30]. Nie można wykluczyć, że pozytywny wpływ na procesy myślenia jest wynikiem korzystnego działania KYNA na funkcjonowanie narządów wewnętrznych. Znane są leki, które nie wykazują bezpośredniego działania ośrodkowego, ale wpływają na ukrwienie i utlenowanie mózgu [31]. Gdyby podobne było działanie obwodowe KYNA, należałoby rozważyć potrzebę zwiększenia jego zawartości w preparatach poprawiających pamięć.

Podziękowania

Pragniemy złożyć serdeczne podziękowania dr hab. n. med. Tomaszowi Kockiemu za opiekę nad pracą oraz prof. dr hab. n. med. Stanisławowi Czuczwarowi za zrecenzowanie pracy.

Literatura

- [1] Perry E., Howes M. J., *Medicinal plants and dementia therapy: herbal hopes for brain aging?* CNS Neuroscience & Therapeutics, 2011 vol. 17, s. 683-698
- [2] Gorby H. E., Brownawell A. M., Falk M. C., *Do specific dietary constituents and supplements affect mental energy? Review of the evidence.* Nutrition Reviews, 2010 vol. 68, s. 697-718
- [3] Turski M. P., Turska M., Zgrajka W., Bartnik M., Kocki T., Turski W. A., *Distribution, synthesis, and absorption of kynurenic acid in plants.* "Planta Medica", 2011 vol. 77, s. 858-864
- [4] Zgrajka W., Turska M., Rajtar G., Majdan M., Parada-Turska J., *Kynurenic acid content in antirheumatic herbs.* Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 2013 vol. 20, s. 800-802
- [5] Liebig J., *Über Kynurensäure.* Justus Liebigs Annalen der Chemie 1853 vol. 86, s. 125-126
- [6] Turski W. A., Gramsbergen J. B., Traitler H., Schwarcz R., *Rat brain slices produce and liberate kynurenic acid upon exposure to L-kynurenine.* J. Neurochem, 1989 vol. 52, s. 1629-1636
- [7] Ganong A. H., Cotman C. W., *Kynurenic acid and quinolinic acid act at N-methyl-D-aspartate receptors in the rat hippocampus.* Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1986 vol. 236, s. 293-299

- [8] Hilmas C., Pereira E. F., Alkondon M., Rassoulpour A., Schwarcz R., *Albuquerque E. X., The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications.* The Journal of Neuroscience, 2001 vol. 21, s. 7463-7473
- [9] Pocivavsek A., Wu H. Q., Potter M. C., Elmer G. I., Pellicciari R., Schwarcz R., *Fluctuations in Endogenous Kynurenic Acid Control Hippocampal Glutamate and Memory.* Neuropsychopharmacology, 2011 vol. 36, s. 2357-2367
- [10] Potter K., *Homocysteine and cardiovascular disease: should we treat?* The Clinical Biochemist Reviews, 2008 vol. 29, s. 27-30
- [11] Turski M. P., Turska M., Paluszkiewicz P., Parada-Turska J., Oxenkrug G. F., *Kynurenic Acid in the Digestive System-New Facts, New Challenges.* Int J Tryptophan Res, 2013 vol. 6, s. 47-55
- [12] Albuquerque E. X., Schwarcz R., *Kynurenic acid as an Antagonist of alpha7 Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Brain: Facts and Challenges.* Biochemical Pharmacology, 2013 vol. 85, s. 1027-1032
- [13] Moroni F., Cozzi A., Sili M., Mannaioni G., *Kynurenic acid: a metabolite with multiple actions and multiple targets in brain and periphery.* Journal of Neural Transmission, 2012 vol. 119, s. 133-139
- [14] Szalardy L., Zadori D., Toldi J., Fulop F., Klivenyi P., Vecsei L., *Manipulating kynurenic acid levels in the brain – on the edge between neuroprotection and cognitive dysfunction.* Current Topics in Medicinal Chemistry, 2012 vol. 12, s. 1797-1806
- [15] Wang J., Simonavicius N., Wu X., Swaminath G., Reagan J., Tian H., Ling L., *Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35.* The Journal of Biological Chemistry, 2006 vol. 281, s. 22021-22028
- [16] Kaszaki J., Palasthy Z., Erczes D., Racz A., Torday C., Varga G., Vecsei L., Boros M., *Kynurenic acid inhibits intestinal hypermotility and xanthine oxidase activity during experimental colon obstruction in dogs.* Neurogastroenterology and Motility, 2008 vol. 21, s. 53-62
- [17] Lugo-Huitron R., Blanco-Ayala T., Ugalde-Muniz P., Carrillo-Mora P., Pedraza-Chaverri J., Silva-Adaya D., Maldonado P. D., Torres I., Pinzon E., Ortiz-Islas E., Lopez T., Garcia E., Pineda B., Torres-Ramos M., Santamaria A., La C., V., *On the antioxidant properties of kynurenic acid: Free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress.* Neurotoxicology and Teratology, 2011 vol. 33, s. 538-547
- [18] Walczak K., Zurawska M., Kis J., Starownik R., Zgrajka W., Bar K., Turski W. A., Rzeski W., *Kynurenic acid in human renal cell carcinoma: its antiproliferative and antimigrative action on Caki-2 cells.* Amino Acids, 2012, s.
- [19] Walczak K., Turski W. A., Rzeski W., *Kynurenic acid enhances expression of p21 Waf1/Cip1 in colon cancer HT-29 cells.* Pharmacological Reports, 2012 vol. 64, s. 745-750
- [20] Solari S. V., Stoner R., *Cognitive consilience: primate non-primary neuroanatomical circuits underlying cognition.* Frontiers in Neuroanatomy, 2011 vol. 5, s. 65
- [21] Park P., Volianskis A., Sanderson T. M., Bortolotto Z. A., Jane D. E., Zhuo M., Kaang B. K., Collingridge G. L., *NMDA receptor-dependent long-term potentiation*

- comprises a family of temporally overlapping forms of synaptic plasticity that are induced by different patterns of stimulation.* Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2014 vol. 369, s. 20130131
- [22] Collingridge G., *Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory.* Nature, 1987 vol. 330, s. 604-605
- [23] Perkins M. N., Stone T. W., *Actions of kynurenic acid and quinolinic acid in the rat hippocampus in vivo.* Experimental Neurology, 1985 vol. 88, s. 570-579
- [24] Turski M. P., Turska M., Zgrajka W., Kuc D., Turski W. A., *Presence of kynurenic acid in food and honeybee products.* Amino Acids, 2009 vol. 36, s. 75-80
- [25] Fukui S., Schwarcz R., Rapoport S. I., Takada Y., Smith Q. R., *Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism.* Journal of Neurochemistry, 1991 vol. 56, s. 2007-2017
- [26] Smith Q. R., *Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier.* Journal of Nutrition, 2000 vol. 130, s. 1016S-1022S
- [27] Maj J., Rogoz Z., Skuza G., Kolodziejczyk K., *Some central effects of kynurenic acid, 7-chlorokynurenic acid and 5,7-dichloro-kynurenic acid, glycine site antagonists.* Polish Journal of Pharmacology, 1994 vol. 46, s. 115-124
- [28] Glavin G. B., Pinsky C., *Kynurenic acid attenuates experimental ulcer formation and basal gastric acid secretion in rats.* Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, 1989 vol. 64, s. 111-119
- [29] Glavin G. B., Bose R., Pinsky C., *Kynurenic acid protects against gastroduodenal ulceration in mice injected with extracts from poisonous Atlantic shellfish.* Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatr, 1989 vol. 13, s. 569-572
- [30] Malaczewska J., Siwicki A. K., Wojcik R., Kaczorek E., Turski W. A., *Effect of dietary administration of kynurenic acid on the activity of splenocytes of the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss).* Central European Journal of Immunology, 2013 vol. 38, s.
- [31] Froestl W., Pfeifer A., Muhs A., *Cognitive enhancers (nootropics). Part 3: drugs interacting with targets other than receptors or enzymes. disease-modifying drugs.* Journal of Alzheimer's Disease, 2013 vol. 34, s. 1-114

Zawartość kwasu kynureninowego w preparatach ziołowych poprawiających pamięć

Streszczenie

Na przestrzeni wieków poszukiwano ziół, które wpływają na lepszą koncentrację, poprawiają zdolności intelektualne oraz procesy pamięciowe. Współcześnie preparaty ziołowe i suplementy diety „poprawiające pamięć” cieszą się dużą popularnością. Jednym ze składników, który występuje w ziołach jest kwas kynureninowy (KYNA). Jest on antagonistą receptorów glutaminianergicznym oraz nikotynowego receptora $\alpha 7$. Oba te receptory odgrywają istotną rolę w neuroprzekaznictwie i plastyczności mózgu. Istnieją doniesienia naukowe sugerujące, że KYNA ma niekorzystny wpływ na procesy uczenia się i pamięci. W związku z tym celem pracy było zbadanie obecności i stężenia KYNA w popularnych preparatach ziołowych stosowanych w celu poprawy procesów pamięci. Do badań wybrano 10 ziół i suplementów diety. Wszystkie preparaty ziołowe zostały przygotowane zgodnie z instrukcją podaną przez producentów. Badaniu poddano wyciąg z ziół. KYNA izolowano na żywicy jonowymiennej Dowex 50. Oznaczenie ilościowe przeprowadzono za pomocą chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją fluorometryczną. KYNA został wykryty we wszystkich badanych produktach. Najwięcej KYNA w przeliczeniu na

maksymalne dobowe spożycie zawierały nasiona kozieradki (61,6 µg/dobę). Ziołami z dużą zawartością KYNA są także kwiatostan głogu (19,8 µg/dobę) oraz liść mięty pieprzowej (19,5 µg/dobę). Najmniej KYNA zawierają suplementy diety MB-Active (0,05 µg/dobę) oraz Active žen-szeń Multi Tabs (0,09 µg/dobę). We wcześniejszych pracach udowodniono, że KYNA bardzo dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego, jednak w warunkach fizjologicznych słabo przenika przez barierę krew-mózg. Wydaje się, że KYNA wpływając na funkcjonowanie narządów obwodowych może pośrednio korzystnie oddziaływać na sprawność układu nerwowego. Dlatego należy rozważyć potrzebę zwiększenia zawartości KYNA w popularnych suplementach diety „poprawiających pamięć”.

Słowa kluczowe: kwas kynureninowy, zioła, pamięć

Content of kynurenic acid in herbal preparations used for memory improvement

People have tried to develop new pathways for learning and improve memory for ages. There are lots of herbs which help humans concentrate better. One of the ingredients in herbal preparations is kynurenic acid (KYNA). It is an antagonist of glutamatergic N-methyl-D-aspartate and nicotinic $\alpha 7$ receptors. Inhibition of these receptors may impair learning and memory. Therefore, the aim of the study was to assess the presence and compare the content of KYNA in popular dietary supplements and herbal preparations used for memory improvement. 10 medical herbs and supplements were chosen. All herbs were prepared according to manufacturers' directions. KYNA level was determined by means of the high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. KYNA was found in all investigated products. The highest amount of KYNA in a maximum daily dose appeared in *Trigonella foenum-graecum* L. (61.6 µg), whereas the lowest content of KYNA was detected in MB-Active (0.05 µg) and Active žen-szeń Multi Tabs (0.09 µg). Previous studies suggest that KYNA possesses therapeutic potential, especially in the digestive system, however it does not cross blood-brain barrier. Nevertheless, KYNA included in various preparations which may influence the peripheral tissues might indirectly influence the activity of the nervous system. Therefore, the increase of KYNA content in dietary supplements for brain memory and mind should be considered.

Key words: kynurenic acid, herbs, memory

INDEKS AUTORÓW

Amarowicz Magdalena	19	Majewska Elżbieta	67
Barchiewicz Katarzyna	95	Markowska Martyna	67
Choroszyńska Dorota.....	57, 77	Mulawka Dominika	19
Chwil Paulina.....	19	Mulawka Paulina	19
Dybek Joanna.....	7	Niedojadło Alicja.....	67
Gawroński Maciej.....	43	Okła Karolina.....	77
Gębura Joanna.....	7	Osiak Magdalena	57
Gil Karolina	67	Pająk Natalia	57
Gil-Kulik Paulina	67	Pelak Jakub	107
Goede Arkadiusz.....	27	Schab Katarzyna	19
Golińska Joanna.....	27	Sobstyl Jan	19
Grad Anna.....	67	Sobstyl Paulina	19
Iwaniuk Adam.....	107	Terlecki Karol.....	19
Jończyk Karolina	95	Turska Monika.....	107
Kałakucka Katarzyna	67	Turski Michał P.	107
Karwat Jolanta	67	Urbańczuk Marcin	19
Kołodziej Ewa.....	67	Wandtke Tomasz	27, 43
Kopiński Piotr	43	Wawruszak Anna.....	77
Kotula Lidia	19, 67	Wielikdzień Joanna.....	27, 43
Król Sylwia Katarzyna.....	57, 77	Winiarczyk Krystyna	7
Kulisz Katarzyna.....	67	Żmurek Dominika.....	67
Macheta Arkadiusz	57		