

Postępy w naukach medycznych

Progresses in medical sciences

1

Redakcja

Grzegorz Winiarski

Mirosław Szala

Kamil Maciąg

Politechnika Lubelska

Lublin 2013

Postępy w naukach medycznych

Progresses in medical sciences

1

Politechnika Lubelska 60 lat



Postępy w naukach medycznych

Progresses in medical sciences

1



redakcja

Grzegorz Winiarski

Mirosław Szala

Kamil Maciąg



Politechnika Lubelska

Lublin 2013

RECENZENCI

dr hab. Krzysztof Grzywnowicz, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

prof. dr hab. Martyna Kendefer-Szerszeń, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

dr hab. Janusz Kocki, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

dr hab. Artur Niedzielski, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

dr hab. Roman Paduch, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Wszystkie opublikowane artykuły zostały pozytywnie zrecenzowane

Wydano za zgodą Rektora Politechniki Lubelskiej

© Copyright by Politechnika Lubelska 2013

ISBN 978-83-63569-63-1

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

ARKADIUSZ CZERWONKA, ALEKSANDRA ŻUREK	
AGAMMAGLOBULINEMIA BRUTONA – PIERWOTNY NIEDOBÓR ODPORNOŚCI ZWIĄZANY Z DOJRZEWANIEM LIMFOCYTÓW B.....	6
EDYTA LIPSKA, MAŁGORZATA LEWIŃSKA	
CIAŁA OBCE NOSA – STAN ZAGROŻENIA ŻYCIA CZY BŁAHA SPRAWA?	16
EWA KOŁODZIEJ, DOROTA KOŁODZIEJ, LIDIA KOTUŁA, SYLWIA KIELBASA, JOLANTA KARWAT, PAULINA GIL–KULIK	
KINESIOTAPING W KOMPLEKSOWEJ FIZJOTERAPII.....	26
JAN SOBSTYL, PAULINA JANIEC	
KWAS FOLIOWY – SKUTKI BŁĘDNEJ SUPLEMENTACJI, WADY CEWY NERWOWEJ	38
KAROLINA GASIŃSKA, ANNA SZAJERSKA, JERZY BEDNARSKI, JAN SOBSTYL, PAULINA JANIEC	
NOWOCZESNE LECZENIE CHOROBY PARKINSONA – TERAPIA GENOWA	46
OLGA RODZIK, OLGA ZALESKA	
NOWOTWOROWE KOMÓRKI MACIERZYSTE	56
NATALIA BILSKA, JUSTYNA PIROG, PAULINA GIL–KULIK	
OD TECHNIKI PRAŻKOWANIA DO ZAAWANSOWANYCH METOD MOLEKULARNYCH – CZYLI O HISTORII CYTOGENETYKI	66
JUSTYNA DULEMBA, ANNA MATUSZEWSKA, DAWID STEFANIUK, MAGDALENA JASZEK	
PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA PROTEAZ CYSTEINOWYCH I ICH INHIBITORÓW W BIOTECHNOLOGII I MEDYCYNIE.....	75
MARCIN CHILKIEWICZ, MAGDALENA JASZEK, DAWID STEFANIUK, ANNA MATUSZEWSKA	
PROTEAZY SERYNOWE I ICH INHIBITORY JAKO NOWOCZESNE NARZĘDZIA WYKORZYSTYWANE W MEDYCYNIE I BIOTECHNOLOGII.....	98
INDEKS AUTORÓW	120

Agammaglobulinemia Brutona – pierwotny niedobór odporności związany z dojrzewaniem limfocytów B

1. Pierwotne niedobory odporności i agammaglobulinemia Brutona

Pierwotne niedobory odporności (PID – Primary immunodeficiency disorders) to grupa obejmująca przeszło 250 schorzeń o różnym podłożu genetycznym i zróżnicowanym stopniu nasilenia objawów. Choroby te charakteryzują się zaburzeniami w rozwoju i funkcji układu odpornościowego co w 75% przypadków ma związek z nieprawidłową produkcją immunoglobulin [1]. PID są niewątpliwie jednymi z najczęstszych chorób o podłożu genetycznym, które wywierają istotny wpływ na śmiertelność populacji w wyniku licznych zakażeń drobnoustrojami [2]. W Europie, szacunkowo występują średnio u 1: 2000 żywo urodzonych dzieci, a globalnie wskaźnik ten wynosi w przybliżeniu 1:1200. Zgodnie z danymi (European Society of Immunodeficiencies) na 7567 zarejestrowanych europejskich pacjentów z niedoborami w produkcji immunoglobulin u 813 zdiagnozowano agammaglobulinemie [1]. Pierwotne niedobory odporności mogą być związane z defektami [3]:

- limfocytów B (upośledzenie odporności humoralnej),
- limfocytów T (upośledzenie odporności związanej z komórkami Tc, Th Treg),
- obu populacji limfocytów (CIDs – combined B- and T-cell immunodeficiency disorders),
- komórek fagocytarnych lub białek układu dopełniacza.

Spośród PID na szczególną uwagę zasługuje agammaglobulinemia Brutona zwana również agammaglobulinemią sprzężoną z chromosomem X (ang. X linked agammaglobulinemia – XLA). Schorzenie genetyczne, które po raz pierwszy opisał w 1952 r. amerykański pediatra Ogden Bruton [4]. Intensywnie prowadzone badania doprowadziły w 1993 roku do bezpośredniego powiązania tej jednostki chorobowej z uwarunkowanym genetycznie deficytem jednej z cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych, nazwaną kinazą Brutona [5,6].

Charakterystycznymi objawami związanym z XLA jest brak lub wykrywanie jedynie śladowych ilości wszystkich izotypów immunoglobulin w surowicy krwi czyli agammaglobulinemia i bardzo niski poziom dojrzałych obwodowych

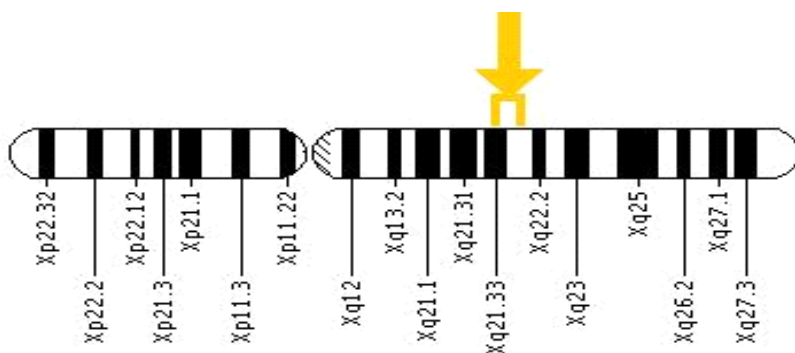
¹arkadiuszczerwonka87@interia.pl Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii

²zurekaleksandra@wp.pl SKN Biotechnologów „Mikron” Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Wydział Biologii i Biotechnologii, Zakład Wirusologii i Immunologii

limfocytów B (około 1% – 2%) [7]. Skutkuje to poważnym upośledzeniem odpowiedzi immunologicznej typu humoralnego. Konsekwencjami XLA są więc liczne bakteryjne, grzybowe i pierwotniacze infekcje, często zagrażające życiu pacjenta. Co ciekawe zazwyczaj w przebiegu choroby poziom i aktywność limfocytów T pozostaje w normie, przez co znacznie mniejszą rolę odgrywają infekcje wirusowe.

2. Molekularne podłoże choroby

XLA wywołują mutacje w genie *ltk* (zbudowanym z 36778 par zasad) znajdującym się na chromosomie X (Xq21.3–Xq22). Gen ten koduje dwiętnasto–egzonowe mRNA dla kinazy tyrozynowej Brutona (BTK, białko zbudowane z 659 aminokwasów o masie 77 kDa)[7,8].



Rys. 1. Umiejscowienie genu *ltk* na chromosomie X (9)

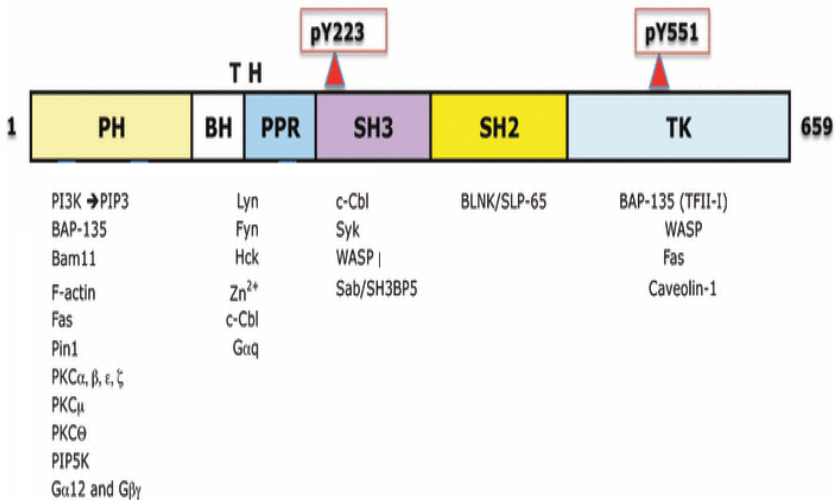
Mutacja występuje szacunkowo u 1:250000 nowo narodzonych dzieci [10]. Jak dotąd zdiagnozowano ponad 500 różnych mutacji tego genu (duplikacje egzonów, przesunięcie ramki odczytu, mutacje nonsensowne itp.) [11]. doprowadzających do powstania XLA w wyniku utraty funkcji białka. Ponad 65% [8] diagnozowanych przypadków związana jest z dziedziczeniem, często specyficznym dla danej rodziny, zmutowanego genu *ltk*, przenoszonym w typowy sposób dla chorób sprzężonych z płcią – z matki nosicielki na męskie potomstwo wykazujące objawy choroby. Pozostałe zachorowania związane są z powstaniem mutacji *de novo* (znacznie częściej dotyczą mężczyzn niż kobiet). Tak więc ilość odkrywanych mutacji systematycznie rośnie. W 15% przypadków zaburzeń o identycznym obrazie klinicznym do XLA nie stwierdza się mutacji *ltk*. Ma to związek z innymi wadami w procesach dojrzewania limfocytów B. Przypadki te mogą być dziedziczone zarówno autosomalnie dominująco (mutacja genu *LRRC8A*) [12] lub autosomalnie recesywnie (mutacje genów *IGHM* – dla łańcucha ciężkiego μ immunoglobulin, *CD79A* – dla składnika transbłonowego receptora $Ig\alpha/Ig\beta$ limfocytów B czy *BLNK* – dla białka pomocniczego kaskady sygnałnej [13]. Podobne jednostki chorobowe

o tym samym podłożu genetycznym diagnozowane są również u myszy i zostały określone mianem chorób deficytu immunologicznego związanych z chromosomem X (Xid – X-linked immunodeficiency disease). Modelowym przykładem może być tu spontaniczna mutacja w genie mysiego *bt*k doprowadzająca do zamiany reszty argininy na cysteinę [14]. Daje to możliwość wykorzystania takiego modelu w celach badawczych.

3. Kinaza tyrozynowa Brutona i jej wpływ na wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałne

BTK należy do rodziny kinaz Tec (u ssaków reprezentowanej jeszcze przez cztery kinazy – Tec, Itk, Txk, Bmx) jednej z największych grup cytoplazmatycznych (nie związanych bezpośrednio z receptorami) kinaz tyrozynowych [15]. Analizy genetyczne pozwoliły ustalić, że homologiczne kinazy, które wykazują bliskie pokrewieństwo z organizmami zwierzęcymi występują już u jednokomórkowych wiciowców kołnierzykowych (takich jak *Monosiga brevicollis* należących do Choanoflagellate). Prawdopodobnie to właśnie z genów występujących u podobnych jednokomórkowych form w toku ewolucji powstała cała rodzina kinaz Tec (obecnie izolowanych u tak odrębnych organizmów jak gąbki, owady, płazy czy ptaki). Ssacza sekwencja genu *bt*k jest już wysoce konserwatywna i w toku ewolucji nie uległa większym zmianom [16]. U ssaków BTK uległa wyspecjalizowaniu i głównie pełni funkcje związane z dojrzewaniem komórek układu odpornościowego. Ulega ekspresji i aktywnie wpływa na rozwój limfocytów B przez cały proces dojrzewania i zanika dopiero po przekształceniu się dojrzałych limfocytów B w komórki plazmatyczne [17]. W budowie kinazy Brutona [8,18,19] od N-terminalnego końca możemy wyodrębnić pięć następujących domen:

- PH (pleckstrin homology) wiążąca trifosforany fosfatydylinozytolu,
- TH (Tec homology) region z wysoce konserwatywnym motywem wiążącym kationy Zn^{2+} które, są wymagane do prawidłowej stabilności białka,
- SH3 (Src homology 3) i SH2 (Src homology 2) regiony umożliwiające aktywację kinazy (poprzez autofosforylację 223 reszty tyrozyny) oraz interakcję BTK z innymi białkami (poprzez rozpoznawanie w ich strukturze ufosforylowanych reszt aminokwasowych),
- SH1 o aktywności kinazy tyrozynowej z resztą tyrozyny w pozycji 551, która musi zostać ufosforylowana w celu aktywacji kinazy (poprzez działanie kinaz z rodziny Src, np.: Lyn).



Rys.2. Budowa BTK ze względu na domeny oraz białka i jony prawdopodobnie oddziałujące z kinazą. Miejsca wymagane do aktywacji BTK, zaznaczono czerwonymi trójkątami [19]

BTK Jest kluczowym elementem wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałnego dojrzewających limfocytów B. Początkowo w szpiku kostnym z dzielących się hematopoetycznych komórek macierzystych linii limfoidalnej, powstają prekursorzy limfocytów B, komórki pro-B (ang. progenitor B-cell) dające się identyfikować poprzez obecność charakterystycznych markerów w postaci CD34 i transferazy deoksynukleotydów terminalnych – TdT. Komórki te nie posiadają jeszcze ciężkiego cytoplazmatycznego łańcucha μ , który musi zostać wytworzony aby powstał powierzchniowy receptor limfocytów [20,21]. Komórka pro-B przekształca się w kolejne stadium rozwoju, limfocyt pre-B, pod wpływem sygnału aktywacyjnego prawdopodobnie z powierzchniowych heterodimerskich białek receptorowych, $Ig\alpha/Ig\beta$. Struktury te inicjują przekazywanie sygnału do wnętrza komórki poprzez wzrost aktywności kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) produkującej wtórne przekaźniki sygnałne pod postacią trifosforanów fosfatydyloinozytolu (PIP3), które z kolei doprowadzają do rekrutacji BTK (poprzez domeny SH) w pobliże błony komórkowej [22]. To z kolei umożliwia fosforylacyjną aktywację domeny SH1 (Y551) przy udziale kinaz Lyn i Syk [8]. Wówczas BTK uzyskuje zdolność do autofosforylacji (Y223) i wraz z białkiem pomocniczym – BLNK, do aktywacji między innymi fosfolipazy PLC- γ 2 co inicjuje dalszą kaskadę sygnałną. Niewielka część aktywnej BTK może zostać transportowana do jądra, gdzie prawdopodobnie oddziałuje na potencjalne cele molekularne [23]. W konsekwencji aktywacja BTK doprowadza między innymi do wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} (aktywującego białkową kinazę C, która z kolei doprowadza do spadku aktywności BTK), inhibicji czynników

proapoptotycznych oraz do aktywacji elementów szlaku kinaz MAPK – przez co może wykazywać pewien potencjał onkogenny [19,24,25]. Konsekwencją kaskady sygnałnej jest aktywacja wielu czynników transkrypcyjnych, między innymi BAP-135, TFII-I, Bright czy białek z rodziny NF- κ B [25,26]. W przypadku limfocytów szczególnie szeroki wpływ na ekspresję genów wywierają cytoplazmatyczne dimery czynników z rodziny NF- κ B, (np.: zbudowane z podjednostek RelA, c-Rel), nieaktywne z powodu wiązania się z nimi białek inhibitorowych z rodziny I κ B [27]. Szlak inicjowany przez BTK doprowadza do fosforylacyjnego oznaczenia I κ B (poprzez kinazę IKK) kierującego inhibitor do rozkładu proteosomalnego zależnego od ubiquitynacji [28], co w konsekwencji doprowadza do uwolnienia czynników transkrypcyjnych z rodziny NF- κ B. Tak więc całokształt szlaków sygnałnych umożliwia przeżycie, proliferację i rearanżację genów dla ciężkiego łańcucha immunoglobulin, co z kolei jest niezbędne dla prawidłowego rozwoju i aktywności limfocytów B [29,30].

Poza limfocytami B, BTK jest obecna w komórkach linii mieloidalnej, z której powstają takie komórki jak monocyty, makrofagi, neutrofile, komórki tuczne i megakariocyty, gdzie bierze udział w aktywacji szlaków sygnałnych odpowiedzialnych między innymi za procesy związane z dojrzewaniem i żywotnością komórek, produkcją cytokin i degranulacją komórek [31]. Tak więc u chorych na XLA i te procesy mogą zostać zaburzone [32,33]. Niedawne badania sugerują również związek BTK z przekazywaniem informacji pochodzących od aktywowanych receptorów TLR (Toll-like receptor) takich jak TLR3,4,6,8,9 oraz białek z nimi związanych (Myd88, Mal) Prawdopodobnie ma to wpływ na aktywację komórek np.: NK [34] i ekspresję wielu cytokin prozapalnych (IL-6, TNF- α , IL-12B) [19,35].

4. Leczenie i przebieg XLA

60% przypadków z XLA diagnozuje się bezpośrednio po 6 miesiącu życia, gdy spada poziom matczynych immunoglobulin. Pojawiają się wówczas liczne infekcje bakteryjne [11]. W niektórych przypadkach choroba może pozostać asymptotyczna do 5 roku życia. W obrazie klinicznym może wystąpić niedostatek w rozwoju układu limfatycznego w postaci nierozwiniętych migdałków i węzłów chłonnych [1]. Osoby z XLA wykazują predyspozycję do ciężkich, przewlekłych, zagrażających życiu infekcji błon śluzowych (zapalenie płuc, ropniaki opłucnej, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych) i innych chorób: neurodegeneracyjnych, posocznicy, zapalenia tkanki łącznej lub septycznego zapalenia stawów [7], a nawet do rozwoju chorób nowotworowych [36]. Najczęściej identyfikowanymi mikroorganizmami przy rozpoznaniu choroby są różnorodne gatunki bakterii z otoczką polisacharydową jak: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Moraxella catarrhalis* [1,7] Często identyfikowane są również pierwotniaki

wywołujący giardiozę (*Giardia intestinalis*) lub wywołujące zapalenie opon mózgowych pikornawirusy (ECHO) [1]. W przypadkach XLA z neutropenią często dochodzi do rozwoju sepsy wywołanej gatunkami *Pseudomonas* sp. lub *Staphylococcus* sp. U chorych występuje również szereg objawów nie związanych z infekcjami. Między innymi samoistne choroby jelit, alergie, aseptyczne zapalenie stawów czy zespół przypominający zapalenie skórno-mięśniowe [1,37]. Jak do tej pory jedynym skutecznym sposobem walki z XLA jest systematyczne podawane chorym immunoglobulin (zarówno dożylnie IVIG jak i podskórnym – SCIG) oraz profilaktyczna antybiotykoterapia [1,38]. Niestety w wielu przypadkach (szczególnie związanych z dożylnym podawaniem immunoglobulin) leczeniu towarzyszą niepożądane skutki uboczne, np.: bóle głowy, uderzenia gorąca, bóle pleców, nudności, wymioty, zapaść układu krążenia oraz zaburzenia pracy nerek [11]. Ponadto, terapia jest kosztowna i uciążliwa dla pacjenta, lecz wczesne rozpoznanie, a w konsekwencji związana z nim możliwość natychmiastowej pomocy medycznej, znacznie redukuje ilość infekcji. Pomimo tego nawracające zakażenia i szereg rozwijających się schorzeń wywołuje wysoką śmiertelność u chorych (50% pacjentów umiera przed ukończeniem 45 roku życia) [39]. Tak więc mimo ciągłego postępu w rozwoju metod leczenia XLA wciąż brakuje skutecznej, taniej i nieuciążliwej dla pacjenta terapii. W związku z tym, że w większości przypadków XLA dotyczy mutacji jednego dobrze opisanego genu o określonej funkcji podejmowane są próby kierowanej terapii genowej, między innymi z udziałem wektorów lentiwirusowych zawierających geny dla ciężkiego łańcucha μ i elementów składowych receptora $Ig\alpha/Ig\beta$ [36,40].

5. Podsumowanie

Badania nad XLA dają możliwość lepszego zrozumienia zasad funkcjonowania układu immunologicznego a w szczególności roli i funkcji limfocytów B. Choroba ta jest dobrym przykładem, ukazującym w jaki sposób mutacje pojedynczego genu, lub niewielkiej ich grupy mogą doprowadzić do znacznych zmian w funkcjonowaniu organizmu. Pomimo znacznego stanu wiedzy na temat pierwotnych niedoborów odporności, agammaglobulinemia Brutona pozostaje chorobą trudną w leczeniu dlatego wymagany jest znaczny postęp w obszarach medycyny, biologii molekularnej i mikrobiologii.

Literatura

1. Havlicekova Z., Jesenak M., Freiburger T., Banovcin P. X-linked agammaglobulinemia caused by new mutation in BTK gene: A case report. *Biomedical Papers*. 2013;157:pp.1–4
2. Bousfiha A.A., Jeddane L., Ailal F., Benhsaien I., Mahlaoui N., Casanova J.L., Abel L. Primary Immunodeficiency Diseases Worldwide: More Common than Generally Thought. *Journal of Clinical Immunology*. 2012;33:pp.1–7

3. McCusker Ch., Warrington R. Primary immunodeficiency. Allergy, Asthma & Clinical Immunology. 2011;7(Supplement):pp.1–8
4. Bruton O.C. Agammaglobulinemia. Pediatrics 1952;9:pp.722–727
5. Vetrie D., Vorechovsky I., Sideras P., Holland J., Davies A., Flinter F., Hammarstroem L., Kinnon C., Levinsky R., Bobrow M., Smith C.I.E., Bentley D.R. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein tyrosine kinases. Nature 1993;361:pp.226–233
6. Tsukada S., Saffran D.C., Rawlings D.J., Parolini O., Allen R.C., Klisak I., Sparkes R.S., Kubagawa H., Mohandas T., Quan S., Belmont J.W., Cooper M.D., Conley M.E., Witte O.N. Deficient expression of a B cell cytoplasmic tyrosine kinase. Cell. 1993;72:pp.279–290
7. Lee K.H., Shyur S.D., Chu S.H., Huang L.H., Kao Y.H., Lei W.T., Cheng C.H., Lo C.Y., Chen C.K., Liu L.C. Clinical manifestations and BTK gene defect in 4 unrelated Taiwanese families with Bruton's disease. Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 2011;29:pp.260–265
8. Valiaho J., Smith C.I., Vihinen M. BTKbase: The Mutation Database for X-Linked Agammaglobulinemia. Human Mutation. 2006;27:pp.1209–1217
9. Genetics Home Reference [online], Luty: 2012, [dostęp 10 maja 2013]. Dostępny w World Wide Web: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/BTK>
10. Sukumaran S., Marzan K., Shaham B., Church J.A. A Child with X-Linked Agammaglobulinemia and Entesitis-Related Arthritis. International Journal of Rheumatology. 2011;2011:pp.3
11. Endo L.M., Giannobile J.V., Dobbs A.K., Foote J.B., Szymanska E., Warnock D.G., Cook W.J., Conley M.E., Schroeder H.W. Membranous glomerulopathy in an adult patient with X-linked agammaglobulinemia receiving intravenous gammaglobulin. Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology. 2011;21:pp.405–409
12. Sawada A., Takihara Y., Kim J.Y., Matsuda-Hashii Y., Tokimasa S., Fujisaki H., Kubota K., Endo H., Onodera T., Ohta H., Ozono K., Hara J. A congenital mutation of the novel gene LRRC8 causes agammaglobulinemia in humans. The Journal of Clinical Investigation. 2003;112:pp.1707–1713
13. Conley M.E., Genes required for B cell development. Journal of Clinical Investigation. 2003;112:pp.1636–1638
14. Vihinen M., Belohradsky B.H., Haire R.N., Holinski-Feder E., Kwan S.P., Lappalainen I., Lehtväslaiho H., Lester T., Meindl A., Ochs H.D., Ollila J., Vorechovsky I., Weiss M., Smith C.I. BTKbase, mutation database for X-linked agammaglobulinemia (XLA). Nucleic Acids Research. 1997;25:pp.166–171
15. Smith C.I.E., Islam T.C., Mattsson P.T., Mohamed A.J., Nore B.F., Vihinen M. The Tec family of cytoplasmic tyrosine kinases: mammalian Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk and homologs in other species. BioEssays 2001;23:pp.436–446
16. Ortutay C., Beston F., Mauno N., Vihinen C.I., Smith E. Phylogeny of Tec Family Kinases: Identification of a Premetazoan Origin of Btk, Bmx, Itk, Tec, Txk, and the Btk Regulator SH3BP5. Advances in Genetics. 2008;64:pp.51–80
17. Nawaz, H.M., Kylsten, P., Hamada, N., Yamamoto, D., Smith, C.I.E., Lindvall, J.M. Differential Evolutionary wiring of the tyrosine kinase Btk. PLoS one. 2012;7: e35640
18. Gustafsson M.O., Hussain A., Mohammad D.K., Mohamed A.J., Nguyen V., Metalnikov P., Colwill K., Pawson T., Smith C.I., Nore B.F. Regulation of nucleocytoplasmic shuttling of Bruton's tyrosine kinase (Btk) through a novel

- SH3-dependent interaction with ankyrin repeat domain 54 (ANKRD54). *Molecular and Cellular Biology*. 2012;32:pp.2440–2453
19. Mohamed A.J., Yu L., Bäckesjö C.M., Vargas L., Faryal R., Aints A., Christensson B., Berglöf A., Vihinen M., Nore B.F., Smith C.I. Bruton's tyrosine kinase (Btk): function, regulation, and transformation with special emphasis on the PH domain. *Immunological Reviews*. 2009;228:pp.58–73
 20. Hokibara S., Agematsu K., Komiyama A. B cell development and primary immunodeficiencies with hypogammaglobulinemia. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2000;48:pp.267–271
 21. Sagaert X., De Wolf-Peeters C. Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental lineage. *Immunology Letters*. 2003;90:pp.179–186
 22. Saito K., Scharenberg A.M., Kinet J.P. 2001. Interaction between the Btk PH domain and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate directly regulates Btk. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276:pp.16201–16206
 23. Mohamed A.J., Vargas L., Nore B.F., Bäckesjö C.M., Christensson B., Smith C.I.E. Nucleocytoplasmic shuttling of Bruton's tyrosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275:pp.40614–40619
 24. Khan W.N. Regulation of B lymphocyte development and activation by Bruton's tyrosine kinase. *Immunologic Research*. 2001;23:pp.147–156
 25. Petro J.B., Rahman S.M.J., Ballard D.W., Khan W.N. Bruton's Tyrosine Kinase Is Required for Activation of I κ B Kinase and Nuclear Factor κ B in Response to B Cell Receptor Engagement. *Journal of Experimental Medicine* 2000;191:pp.1745–1753
 26. Rajaiya J., Nixon J.C., Ayers N., Desgranges Z.P., Roy A.L., Webb C.F. Induction of immunoglobulin heavy-chain transcription through the transcription factor Bright requires TFII-I. *Molecular and Cellular Biology*. 2006;26:pp.4758–4768
 27. Baldwin A.S. The NF- κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*. 1996;14:pp.649–683
 28. Karin M., Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual Review of Immunology*. 2000;18:pp.621–663
 29. Vallabhapurapu S., Karin M. Regulation and Function of NF- κ B Transcription Factors in the Immune System. *Annual Review of Immunology*. 2009;27:pp.693–733
 30. Jimi E., Phillips R.J., Rincon M., Voll R., Karasuyama H., Flavell R., Ghosh S. Activation of NF- κ B promotes the transition of large, CD43+ pre-B cells to small, CD43- pre-B cells. *International Immunology*. 2005;17:pp.815–825
 31. Chang B.Y., Huang M.M., Francesco M., Chen J., Sokolove J., Magadala P., Robinson W.H., Buggy J.J. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 ameliorates autoimmune arthritis by inhibition of multiple effector cells. *Arthritis Research & Therapy*. 2011;13:pp.1–14
 32. Melcher M., Unger B., Schmidt U., Rajantie I.A., Alitalo K., Ellmeier W. Essential roles for the Tec family kinases Tec and Btk in M-CSF receptor signaling pathways that regulate macrophage survival. *Journal of immunology*. 2008;180:pp.8048–8056
 33. Quek L.S., Bolen J., Watson S.P. A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. *Current Biology*. 1998;8:pp.1137–1140
 34. Bao Y., Zheng J., Han C., Jin J., Han H., Liu Y., Lau Y.L., Tu W., Cao X. Tyrosine kinase Btk is required for NK cell activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012;287:pp.23769–23778

35. Marron T.U., Yu J.E., Cunningham–Rundles C. Toll–like receptor function in primary B cell defects. *Frontiers in Bioscience*. 2012;4:pp.1853–1863
36. Kerns H.M., Ryu B.Y., Stirling B.V., Sather B.D., Astrakhan A., Humblet–Baron S., Liggitt D., Rawlings D.J. B cell–specific gene therapy leads to sustained B–cell functional recovery in a murine model of X–linked agammaglobulinemia. *Blood*. 2010;115:pp.2146–2155
37. Behniafard N., Aghamohammadi A., Abolhassani H., Pourjabbar S., Sabouni F., Rezaei N. Autoimmunity in X–linked agammaglobulinemia: Kawasaki disease and review of the literature. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2012;8:pp.155–159
38. Wasserman R.L., Church J.A., Stein M., Moy J., White M., Strausbaugh S., Schroeder H., Ballow M., Harris J., Melamed I., Elkayam D., Lumry W., Suez D., Rehman S.M. Safety, efficacy and pharmacokinetics of a new 10% liquid intravenous immunoglobulin (IVIG) in patients with primary immunodeficiency. *Journal of Clinical Immunology*. 2012;32:pp.663–669
39. Plebani A., Soresina A., Rondelli R., Amato G.M., Azzari C., Cardinale F., Cazzola G., Consolini R., De Mattia D., Dell'Erba G., Duse M., Fiorini M., Martino S., Martire B., Masi M., Monafò V., Moschese V., Notarangelo L.D., Orlandi P., Panei P., Pession A., Pietrogrande M.C., Pignata C., Quinti I., Ragno V., Rossi P., Sciotto A., Stabile A. Clinical, immunological, and molecular analysis in a large cohort of patients with X–linked agammaglobulinemia: an Italian multicenter study. *Clinical immunology*. 2002;104:pp.221–230
40. Sather B.D., Ryu B.Y., Stirling B.V., Garibov M., Kerns H.M., Humblet–Baron S., Astrakhan A., Rawlings D.J. Development of B–lineage predominant lentiviral vectors for use in genetic therapies for B cell disorders. *Molecular Therapy : the Journal of the American Society of Gene Therapy*. 2011;19:pp.515–525

**Pracę recenzowała: Prof. dr hab. Martyna Kandefer–Szerszeń.
Uniwersytet Marii Curie–Sklodowskiej w Lublinie. Wydział Biologii
i Biotechnologii, Instytut Biologii i Biochemii, Zakład Wirusologii
i Immunologii**

**Agammaglobulinemia Brutona – pierwotny niedobór odporności związany
z dojrzewaniem limfocytów B**

Streszczenie:

Agammaglobulinemia Brutona (lub agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X – XLA) jest jedną z najwcześniej opisanych chorób z grupy pierwotnych niedoborów odporności (PID). W większości przypadków powstaje na skutek mutacji w genie *bt* kodującym kinazę tyrozynową Brutona (BTK). Białko to jest odpowiedzialne za dojrzewanie limfocytów B. Utrata aktywności kinazy doprowadza do spadku aktywności oraz zahamowania proliferacji komórek. Skutkuje to obniżeniem liczby dojrzałych limfocytów B i agammaglobulinemią. BTK odgrywa również ważną rolę w procesach degranulacji i produkcji cytokin niektórych komórek układu odpornościowego. Pacjenci z XLA są narażeni na częste infekcję bakteryjne (powszechne bakterie wywołujące zapalenia ropne takie jak *Streptococcus pneumoniae* lub *Haemophilus influenzae*) wirusowe (ECHO wirus) i pierwotniacze (*Giardia intestinalis*). Obecnie leczenie XLA obejmuje podawanie immunoglobulin (zarówno dożylnie jak i podskórną) oraz profilaktyczną antybiotykoterapię, chociaż podjęto badania w kierunku możliwości zastosowania terapii genowej.

Słowa Kluczowe: Agammaglobulinemia Brutona, BTK

**Bruton's agammaglobulinemia – primary immunodeficiency syndrome
associated with the maturation of B cells**

Abstract:

Bruton's agammaglobulinemia (or X-linked agammaglobulinemia – XLA) was one of the first described primary immunodeficiency disorders (PID). In most cases the disease is caused by mutations in the *bt* gene coding for Bruton's tyrosine kinase (BTK). This protein is critical for the maturation of B cells which dysfunction leads to disorder of B-cell differentiation, development and activity. It leads to absence of peripheral mature B cells and hypogammaglobulinemia. BTK plays also important role in cytokine production and cell degranulation. Patients with XLA are at risk for frequent recurrent bacterial (commonly pyogenic *Streptococcus pneumoniae* or *Haemophilus influenzae*), viral (ECHO virus) and protozoal (*Giardia intestinalis*) infections. So far the basic medical treatment is based on intravenous or subcutaneous application of immunoglobulins and prophylactic antibiotic therapy although there are indications for gene therapy trials.

Key words: Bruton's agammaglobulinemia, BTK

Ciała obce nosa – stan zagrożenia życia czy błaha sprawa?

Wstęp

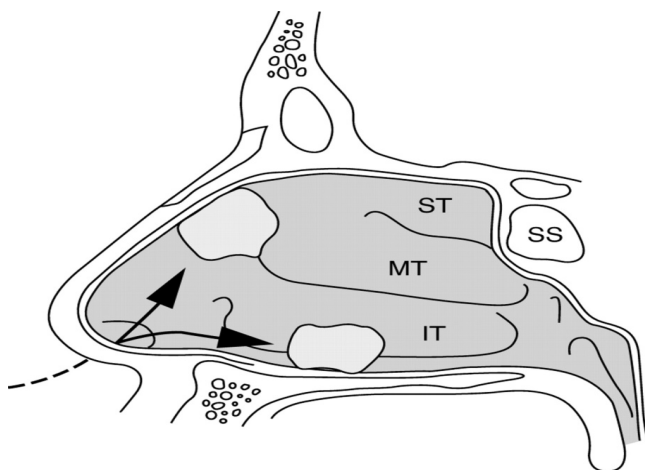
Ciało obce w nosie jest jedną z najczęstszych przyczyn jednostronnego upośledzenia drożności nosa u dzieci. W 80% przypadków dotyczy dzieci w wieku 2–4 lat i jest zazwyczaj przypadkową konsekwencją zabawy i braku nadzoru. W wieku starszym zdarza się to raczej chorym psychicznie lub niepełnosprawnym umysłowo. O tym, co można znaleźć w nosie dziecka, każdy lekarz dyżurny Oddziału Otolaryngologii Dziecięcej może opowiedzieć swoją własną historię. Począwszy od kulek, pinezki, śrubki, klocka, kamienia poprzez różnego rodzaju papierki a skończywszy na kukurydzy, grochu, pestki, baziach i innych fragmentach roślin. Uzależnione jest to od inwencji dziecka, niefrasobliwości rodziców, dostępnych przedmiotów w otoczeniu a nawet pory roku. Najczęściej ciało obce przenika do jamy nosowej przez nozdrza przednie, rzadziej przez nozdrza tylne, na przykład podczas kaszlu, wymiotów lub ziewania (rys. 1.).

1. Objawy obecności ciała obcego w jamie nosowej

Objawy zależą od kształtu, wielkości ciała obcego, a także czasu zalegania w jamie nosowej. Objawami sugerującymi zaleganie ciała obcego może być ból nosa, wyciek śluzowej wydzieliny, zaczerwienienie nosa, jednostronne lub obustronne upośledzenie drożności nosa, krwawienie, ropna wydzielina z nosa o nieprzyjemnym zapachu, często podbarwiona krwią. W początkowym okresie jedyną reakcją może być kichanie lub łzawienie. Obecność niewielkiego ciała obcego może pozostać długo niezauważona, nawet przez kilka miesięcy. Dlatego rodzice czasem się nie orientują, co się stało. Długo zalegające ciała obce mogą przybierać formę kamienia nosowego (rynolitu) (rys. 2.).

¹ edytalipska1989@o2.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Otolaryngologii Dziecięcej, Foniatrii i Audiologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angielskojęzycznym, opiekun: dr n.med Artur Niedzielski, kierownik Kliniki prof. dr hab.n. med. Grażyna Mielnik–Niedzielska

² malewinska@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Otolaryngologii Dziecięcej, Foniatrii i Audiologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Angielskojęzycznym, opiekun: dr n.med Artur Niedzielski, kierownik Kliniki prof. dr hab.n. med. Grażyna Mielnik–Niedzielska



Rys.1. Miejsca najczęstszej lokalizacji ciał obcych w jamie nosowej [zasoby Internetu]



Rys.2. Rynolit [opracowanie własne]

Większe rozmiary ciała obcego wiążą się z szybszym wystąpieniem dolegliwości – natychmiast pojawia się ból i jednostronne upośledzenie drożności nosa. Zalegające, pęczniejące ciało obce może być przyczyną bólów głowy. W większości przypadków ciało obce zalega w przedniej części jamy nosowej na wysokości przewodu nosowego dolnego lub środkowego, wtedy określenie jego lokalizacji nie sprawia większych problemów. O wiele trudniejsze do zlokalizowania jest ciało obce małych rozmiarów położone w tylnej części jamy nosowej (zwłaszcza gdy znajduje za skrzywioną przegrodą) [1].

Trudności diagnostyczne może sprawić również długo zalegające ciało obce. Oprócz upośledzonej drożności dochodzi wówczas do jednostronnego przewlekłego nieżytu nosa oraz pojawienia się ropnej lub krwistej wydzieliny, a nawet wytworzenia ziarniny wokół ciała obcego (rys. 3.).



Rys.3. Jednostronny wyciek krwistej wydzieliny z nosa [zasoby Internetu]

Wyjątkowo niebezpiecznym materiałem są małe, okrągłe, płaskie baterie, w które bywają zaopatrzone zabawki. W wilgotnym środowisku zaczyna płynąć prąd o niskim napięciu. Na drodze elektrolizy dochodzi do powstania drażniącego chloru i wodorotlenku sodu. Nieszczelność baterii i wyciek zasadowej zawartości może doprowadzić do martwicy rozplywnej.

2. Rodzaje ciał obcych

Organiczne: rośliny strączkowe, kukurydza, groszek, pestki owoców, ziarenka kawy, orzeszki, owady, fragmenty papieru, kreda, cukierki (tic-tac). Nieorganiczne: plastikowe części zabawek, guziki, śrubki, gwoździe, kulki plastikowe, styropian, koraliki, kamyki, plastelina, płaskie baterie, monety. Przedmioty z materiałów pochodzenia organicznego częściej i szybciej wywołują odczyn zapalny.

Do kazuistyki zaliczyć można znalezienie w jamie nosa fragmentu gałązki świerkowej, wciśniętego zgodnie z układem igieł i w związku z tym zaklinowanego nieodwracalnie w jamie nosowej (konieczne było jej usunięcie w warunkach sali operacyjnej przez nosogardło) [2].

3. Postępowanie

Warto spróbować wydmuchać nos. Często jest to metoda wystarczająca. Nie zaleca się jej jednak u bardzo małych dzieci. Dziecko musi bowiem dokładnie rozumieć, co należy zrobić. W skutek stresu i złego zrozumienia polecenia może dojść do efektu odwrotnego. Dziecko wciągnie przedmiot do głębszej części nosa lub nawet do krtani, tchawicy lub oskrzeli.

Należy pamiętać, że samodzielne usuwanie ciał obcych może spowodować poważne komplikacje począwszy od uszkodzenia struktur nosa (błony śluzowej, przegrody nosa, małżowin nosowych) poprzez wklinowanie lub przemieszczenie ciała obcego do dalszych odcinków nosa a skończywszy przesunięciem zalegającego ciała obcego do krtani czy oskrzeli, powodując stan bezpośredniego zagrożenia życia. Z tego powodu uzasadniona jest wizyta u lekarza.

W gabinecie lekarskim konieczne jest stworzenie warunków dla spokojnego zbadania dziecka i wykonania zabiegu, tj. krótkotrwałe znieczulenie, dobre oczyszczenie nosa, odessanie treści ropnej i anemizacja błony śluzowej nosa [3].

W warunkach ambulatoryjnych, a więc np. w gabinecie lekarza rodzinnego, należy ograniczyć się do jednej próby usunięcia ciała obcego. Starsze dzieci trzeba poprosić o współpracę, natomiast u młodszych dzieci należy o pomoc poprosić rodzica, by zmniejszyć strach dziecka. Ciała obce krótko znajdujące się oraz nie wklinowane pod małżowinę nosową, są dobrze widoczne w czasie rynoskopii. Zalegające dłużej otoczone są ziarniną, brudną wydzieliną ropną i powodują łatwe krwawienie, nawet przy niewielkim dotyku. Badanie radiologiczne może być przydatne, jednak wykrywa tylko te ciała, które zatrzymują promienie (rys. 4.).



Rys.4. Zdjęcie RTG czaszki z widocznym ciałem obcym– metalową nakrętką w jamie nosowej [opracowanie własne]

W celu wykonania próby usunięcia ciała obcego, należy najpierw zlokalizować wzrokiem przedmiot tkwiący w jamie nosowej i dokładnie zaplanować, co się chce zrobić. Nieprzemyślane postępowanie może doprowadzić do zepchnięcia ciała obcego w głąb jamy nosowej i zaaspirowania do tchawicy lub oskrzeli. Z uwagi na możliwość wystąpienia takich powikłań, nie wolno ciała obcego usuwać „na siłę”, ale należy udać się z dzieckiem do laryngologa. Tam w odpowiednim świetle i przy pomocy odpowiednich narzędzi laryngolog usunie ciało obce, starając się przy tym nie uszkodzić żadnych struktur nosa i „uwolni dziecko od kłopotu” (rys. 5.). Laryngolog usuwa ciało obce w znieczuleniu miejscowym z anemizacją błony śluzowej nosa za pomocą odpowiedniego sprzętu: lampa czołowa, wziernik nosowy, pęsety, kleszczyki hemostatyczne, małe tępe haczyki, cewniki Foleya.



Rys. 5. Lekarz laryngolog z lampą czołową [opracowanie własne]

Przedmioty miękkie takie jak wata, kawałki materiału lub papieru wypełniające szczelnie jamę nosową można próbować usunąć silnie wdmuchując powietrze przez usta pacjenta (techniką oddechu usta–usta) przy uciśniętym skrzydełku nosa po niezatkanej stronie. Można również użyć worka samorozprężalnego z maską, trzymaną szczelnie tylko wokół ust [4].

Twardy, kanciasty, niekruszący się przedmiot usuwa się za pomocą haczyka, pęsety lub kleszczyków, ale tylko, gdy nie tkwi on zbyt mocno i można to zrobić pod kontrolą wzroku, bez ryzyka przesunięcia go do tyłu.

Przedmioty okrągłe są trudne do chwycenia narzędziem i łatwiej mogą się przesunąć w tył, co grozi aspiracją. Można wtedy użyć cienkiego cewnika Foleya lub ssaka wytwarzającego podciśnienie (rys. 6.). Odsysanie jest szczególnie przydatne w przypadku rozdrobnionych ciał obcych np. rozkruszonych tabletek.



Rys. 6. Cewnik Foleya wprowadzony do jamy nosowej [4]

Przedmioty duże, zaklinowane, długo zalegające, z towarzyszącym obrzękiem lub ziarniną oraz przy braku współpracy chorego wymagają usunięcia w znieczuleniu ogólnym i intubacji dotchawiczej (rys. 7.). Zawsze należy skontrolować drugą jamę nosową i przewody słuchowe.



Rys. 7. Pacjent przed zabiegiem usunięcia ciała obcego w znieczuleniu ogólnym [opracowanie własne]

4. Powikłania

Ciało obce zalegające w jamie nosa prowadzi do zaburzenia ruchu rzęsek, co wywołuje przewlekłą reakcję zapalną błony śluzowej, która w połączeniu z blokadą nosa i zwolnionym przepływem powietrza powoduje wysychanie błony śluzowej nosa. W konsekwencji tych zaburzeń ciało obce zalegające w jamie nosa stanowi potencjalne jądro, wokół którego może utworzyć się złóg wapienny określany jako kamień nosowy lub rynolit [5]. Rynolit może prowadzić do powstania powikłań, takich jak: odleżyny, perforacje przegrody lub uszkodzenia bocznej ściany nosa [6].

Najgroźniejsze ciała obce to płaskie baterijki z zabawek. Wyciek tych substancji bardzo drażni śluzówkę, co może doprowadzić do martwicy ścianek nosa, przedziurawienia przegrody, dużego uszkodzenia i krwawienia.

Ciało obce w nosie, blokując kanalik nosowo-łzowy, może też prowokować zapalenie spojówek. Inne przedmioty powodują miejscowe drażnienie i rozwój stanu zapalnego, co w konsekwencji może być przyczyną zapalenia zatok przynosowych, zapalenia ucha środkowego, perforacji przegrody nosa, zapalenia nagłośni, a nawet zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych.

Istnieje również ryzyko aspiracji ciała obcego do dróg oddechowych, co może stanowić bezpośrednie zagrożenie dla życia dziecka (rys. 8.).



Rys. 8. Ciało obce zaaspirowane do dolnych dróg oddechowych [opracowanie własne]

5. Materiał i metody

Materiał obejmuje 89 pacjentów w wieku od 2–17 lat, 41 chłopców i 48 dziewczynek, które zostały przyjęte do Kliniki Otolaryngologii Dziecięcej, Foniatrii i Audiologii UM w Lublinie. Dane zostały opracowane w programach Statistica i Excel.

6. Dyskusja wyników

W Klinice Otolaryngologii Dziecięcej, Foniatrii i Audiologii UM w ramach ostrego dyżuru w okresie od stycznia do grudnia 2012 przyjęto 89 dzieci. Było to 41 chłopców i 48 dziewczynek. Pacjenci byli w wieku od 2 do 17 roku życia, przy czym najliczniejszą grupą stanowiły 4-latki.

73% dzieci pochodziło z miast, a 27% ze wsi. Średnio raz na 4 dni trafia dziecko z ciałem obcym zlokalizowanym w jamie nosowej. Jednak problem jest jeszcze częstszy, ponieważ ciała obce mogą być zlokalizowane również w oskrzelach, przełyku i w uchu.

W analizowanym materiale organiczne ciała obce stanowiły 68% (najczęściej były to rośliny strączkowe, kukurydza, groszek, pestki), a 32% nieorganiczne (plastikowe części zabawek, guziki, śrubki, plastikowe kulki, styropian).

Dzięki odpowiedniej reakcji rodziców i interwencji lekarzy laryngologów wszystkie ciała obce zostały usunięte bez powikłań.

Niestety nie zawsze historie z ciałem obcym w jamie nosowej dobrze się kończą. Z każdym wdechem zwiększa się prawdopodobieństwo przesunięcia przedmiotu ku dalszym odcinkom przewodu nosowego. Może tam dojść do zablokowania ciała obcego, bowiem miejsce to jest węższe niż sam otwór nosowy. Ciało obce będzie powodem dyskomfortu dla dziecka, obecność także może stać się przyczyną stanu zapalnego. Istnieje ryzyko aspiracji ciała obcego do dróg oddechowych, a w konsekwencji do zgonu dziecka z powodu zadławienia. Większości rzeczy włożonych do nosa nie można zobaczyć inaczej niż przy pomocy specjalnych narzędzi i oświetlenia. Dlatego nie wolno lekceważyć następujących objawów:

- ból nosa,
- wyciek wydzieliny śluzowej,
- zaczerwienienie nosa,
- jednostronne lub obustronne upośledzenie drożności nosa,
- krwawienia z nosa,
- ropna wydzielina z nosa o nieprzyjemnym zapachu, często podbarwiona krwią.

W tabeli 1 przedstawiono kilka najbardziej istotnych wskazówek, które mogą być pomocne w uchronieniu dziecka przed aspiracją ciała obcego oraz postępowaniu w przypadku pojawienia się objawów alarmujących.

Tabela 1.

NIE WOLNO	NALEŻY
Lekceważyć jednostronnej wydzieliny z nosa u dziecka.	Unikać pozostawiania drobnych przedmiotów w zasięgu małego dziecka.
Wpychać ciała obcego w głąb nosa, bo grozi to jego przesunięciem do gardła i aspiracją do drzewa oskrzelowego.	Dostosowywać zabawki odpowiednio do wieku dziecka.
Podjąć próbę nieprzemyślanej próby usuwania ciała obcego.	Zgłosić się do lekarza zawsze w przypadku zauważenia niepokojących objawów.

Źródło: opracowanie własne przy wykorzystaniu zasobów Internetu

Kiedy pilnie potrzebny jest lekarz?

- Kiedy nie jesteśmy w stanie sami usunąć przedmiotu (nie daje się wydmuchać),
- Kiedy przedmiot, który jest w nosie może spowodować uszkodzenie błony śluzowej nosa (bateria, ostry przedmiot),
- Kiedy ciało obce przesuwa się do dróg oddechowych,
- Kiedy pojawiają się krwotoki z nosa, krwiste wydzieliny, nieprzyjemny zapach z nosa i ust dziecka, obrzęk nosa.

7. Wnioski

Ciała obce tkwiące w jamie nosowej zwykle nie stanowią bezpośredniego zagrożenia życia. Przy pomocy doświadczonego specjalisty laryngologa mogą być usunięte szybko i bez powikłań, o czym świadczą wyniki analizowanego materiału. Należy jednak pamiętać, że nie jest to sprawa błaha i nie można tego problemu lekceważyć.

Literatura

1. Latkowski B. J. Otorynolaryngologia, Warszawa, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, 2004, s.223.
2. Wysocki J., Ciała obce w laryngologii – istotny problem w praktyce ambulatoryjnej i klinicznej, Służba Zdrowia, 2002, 19–22, s.41–43.
3. Iwankiewicz S., Otolaryngologia, Warszawa, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, 1984, s.177.
4. Szczeklik A., Choroby wewnętrzne, Kraków, Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, 2012; s.1215–1217.
5. Kisiel M., Krzeski A., Kamień nosowy – rynolit, Magazyn otorynolaryngologiczny, 2011 10(4), s. 98–104
6. Kot M., Lewandowska M., Kruk–Jeromin J., Ciała obce w jamie nosowej u chorych leczonych z powodu rozszczepu wargi i podniebienia.
7. Family Med. Prim. Care Rev. 2009; 11(3): s. 361–363.

Recenzent pracy: dr n. med. Artur Niedzielski, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Ciała obce nosa – stan zagrożenia życia czy blaha sprawa?

Streszczenie

Przedstawiona praca dotyczy zagadnienia ciał obcych w jamie nosowej u dzieci jako częstego problemu w praktyce ambulatoryjnej i klinicznej. W większości przypadków aspiracja ciała obcego zdarza się u dzieci do 4 roku życia, które podczas zabawy wkładają sobie niepożądany przedmiot do jamy nosowej. W niniejszej pracy przedstawiamy materiał zebrany w okresie od stycznia do grudnia 2012, dotyczący 89 dzieci, które zgłosiły się do Kliniki Otolaryngologii Dziecięcej, Foniatrii i Audiologii z powodu obecności ciała obcego w jamie nosowej. Najczęściej były to drobne elementy zabawek, cukierki i rośliny strączkowe.

U wszystkich pacjentów dzięki, szybkiej i specjalistycznej pomocy lekarzy laryngologów, ciała obce udało się usunąć bez powikłań. Jednak jest to sprawa, której nie należy lekceważyć, ponieważ niewłaściwie udzielona pomoc lub bagatelizowanie objawów i nie zgłoszenie się z dzieckiem do lekarza może być dramatyczne w skutkach.

Słowa Kluczowe: jama nosowa, ciało obce, dzieci

Foreign bodies in the nasal cavities – state of emergency or a small problem?

Abstract

This article a detailed discussion of the different types of nasal foreign bodies which is a common problem in clinical practice. Most of cases includes children up to 4 years old which put toys into the nose during play. Our article presents clinical cases from January to December 2013, applies for 89 children with foreign bodies in the nasal cavity. The most common were small pieces of toys, candies and beans.

Due to fast and professional help all of foreign bodies were pulled out without any complications. However, we cannot neglect this problem, because inappropriate first aid can be disastrous.

Keywords: nasal cavity, foreign bodies, children

Autorzy pracy:

Edyta Lipska

Małgorzata Lewińska

Adres email: edyतालipska1989@o2.pl

Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Studenckie Koło Naukowe przy Klinice Otolaryngologii Dziecięcej, Foniatrii i Audiologii

Ewa Kołodziej¹, Dorota Kołodziej², Lidia Kotuła³, Sylwia Kielbasa⁴,
Jolanta Karwat⁵, Paulina Gil-Kulik⁶

Kinesiotaping w kompleksowej fizjoterapii

Wstęp

Kinesiotaping jest stosunkowo nową metodą fizjoterapii, której popularność na przestrzeni ostatnich lat rośnie. Dzieje się tak ze względu na pozytywny odbiór tej metody zarówno przez personel medyczny, jak i przez pacjentów, oraz rosnący zasób badań naukowych, potwierdzających jej skuteczność w świetle paradygmatu Evidence Based Medicine – EBM – Medycyny Opartej na Faktach. Badania na temat zastosowania kinesiotapingu wciąż trwają, przyczyniając się do powstawania coraz to nowych dowodów naukowych, wspierających zarówno zastosowanie metody, jak i jej efektywność. [1, 2, 3, 4]

Twórca metody to chiropraktyk Kenzo Kase, który opracował i rozwinął ją w roku 1973 jako Kinesio Taping. Używane przez autora plastry to Kinesio Tex Tape. W literaturze, w szczególności anglojęzycznej, można spotkać się również z nazwami kinesiology taping oraz skrótami KT bądź KTA. W artykule przyjęto nazwę występującą w nazewnictwie polskim najczęściej kinesiotaping. Nazwa metody wskazuje na to, iż wykorzystuje ona naukę o ruchu człowieka, kinezylogię.[1, 5]

Początkowo kinesiotaping znajdował zastosowanie przede wszystkim w medycynie sportowej, by z czasem zaistnieć w takich specjalnościach klinicznych, jak ortopedia, traumatologia, chirurgia narządu ruchu, neurologia, onkologia, ginekologia i położnictwo czy pediatria. [2]

¹kolodziej_ewa@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Wydział Pielęgniarstwa i Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

²dorota_kolodziej2@op.pl, Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Wydział Pielęgniarstwa i Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

³zgkumlub@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Medycznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, I wydział lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

⁴zgkumlub@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Medycznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, I wydział lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

⁵zgkumlub@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Medycznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, I wydział lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

⁶zgkumlub@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Medycznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, I wydział lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Uniwersytet Medyczny w Lublinie.

Kinesiotaping może być stosowany w fizjoterapii zarówno jako metoda samodzielna, jak i uzupełniająca dla szeregu innych. Podstawowym jej zadaniem jest wspomaganie struktur w obrębie układu ruchu w powrocie do prawidłowego funkcjonowania za pomocą aplikacji stworzonych do tego celu plastrów. Taśmy są przy produkcji wstępnie rozciągane do 15 – 25% a następnie przyklejane do papierowego podkładu. Można je rozciągnąć do 120 – 140% wyjściowej długości, natomiast po aplikacji charakteryzuje je zdolność powrotu do długości wyjściowej. Bawełniane taśmy zostały zaprojektowane w ten sposób, by imitować fizyczne cechy ludzkiej skóry – uważa się, że mają podobną do naskórka wagę i grubość, jak również właściwości elastyczne. Plastry nakładane są na odpowiednio przygotowaną skórę bezpośrednio, w sposób uzależniony od założonego u danego pacjenta celu terapeutycznego. [1, 3, 6, 7]

1. Informacje ogólne

1.1. Mechanizm działania

Sposób działania plastrów do kinesiotapingu polega na uniesieniu i pofałdowaniu naskórka wraz z warstwą brodawkową skóry właściwej. Prowadzi to do zwiększenia możliwości przepływu krwi w obrębie sieci naczyniowej podbrodawkowej i w naczyniach leżących w głębi skóry oraz zwielokrotnienie transportu chłonki, począwszy od włosniczek chłonnych, brodawek, poprzez sieć chłonną podbrodawkową, do naczyń krwionośnych, dzięki czemu powstają korzystniejsze warunki do regeneracji w obrębie miejsc zmienionych procesem chorobowym. W efekcie dochodzi do normalizacji napięcia mięśniowego, powięziowego, uaktywnienia przepływu krwi i limfy, zmniejszenia dolegliwości bólowych oraz poprawy motoryki. [8, 4]

1.2. Cel aplikacji

Cele, które są stawiane przed poszczególnymi technikami, to przede wszystkim poprawa funkcjonowania układu mięśniowego, normalizacja napięcia mięśniowego (jego obniżenie bądź podwyższenie, w zależności od potrzeb pacjenta), usprawnienie przepływu limfy, działanie przeciwbólowe wynikające z aktywacji endogennego systemu znieczulenia oraz poprawę lokalnego mikrokrążenia. Do niewątpliwych zalet stosowania kinesiotapingu można zaliczyć ciągłość oddziaływania, brak negatywnych odczuć skórnych u pacjenta oraz oszczędność związaną ze stosunkowo długim czasem korzystania z jednej aplikacji (3 do 5 dni) [1].

1.3. Techniki aplikacji

Techniki naklejania plastrów mają za zadanie wspomóc naturalne procesy samoleczenia zachodzące w organizmie ludzkim. [9, 10] Podstawowe techniki

naklejania plastrów na skórę, różnią się między sobą pozycją wyjściową okolicy ciała pacjenta poddawanej oklejaniu, stopniem rozciągnięcia plastra oraz rozciągnięciem skóry, na którą zostanie nałożona taśma. Biorąc pod uwagę te trzy elementy, rozróżnia się następujące techniki:

- Mięśniową, stosowaną najczęściej. Przebieg taśmy odpowiada przebiegowi mięśnia, jest ona naklejana bez napięcia, za to w maksymalnym rozciągnięciu mięśnia poddawanego terapii. W przypadku nadmiernego napięcia mięśnia, w celu normalizacji tonusu mięśniowego, taśmę nakleja się od przyczepu dystalnego do proksymalnego, natomiast jeśli zachodzi potrzeba wspomagania funkcji mięśnia, sposób przyklejenia taśmy jest odwrotny – od przyczepu proksymalnego do dystalnego,
- Więzadłową, w której wykorzystuje się napięcie plastra (25 – 100%). Taśma naklejona bazowo na elementach kostnych ma za zadanie wspomagać pracę więzadeł zarówno przy ich przeciążeniach, jak i po urazach,
- Powięziową, która podobnie jak więzadłowa wykorzystuje napięcie plastra (0 – 85%). Aplikacja ma na celu korekcję ułożenia powięzi na danym obszarze, co wspomaga prawidłową funkcję mięśni i stawów,
- Korekcyjną, będącą modyfikacją techniki powięziowej. Stosuje się rozciągnięcie plastra w zakresie od 25 do 75%, w zależności od stopnia nasilenia miejscowych dolegliwości bólowych,
- Limfatyczną, w której stosuje się bardzo niewielkie rozciągnięcie taśmy (0 – 25%). Podstawowym zadaniem tej techniki jest poprawa krążenia krwi i limfy, co pozwala minimalizować zastoje tkankowe i przyspiesza ustępowanie stanów zapalnych,
- Funkcjonalną, w której stopień napięcia taśmy jest uzależniony od zakresu ruchu w danym stawie. Technika ma za zadanie wspomóc osłabione mięśnie. [1, 3, 5, 9].

2. Kinesiotaping w fizjoterapii klinicznej

2.1. Medycyna sportowa

Taping w pierwszej kolejności znalazł zastosowanie w medycynie sportowej, która wykorzystywała tę formę fizjoterapii do zewnętrznego unieruchomienia lub pożądanego zmniejszenia zakresu ruchu w różnych obszarach narządu ruchu. Taping sportowy jest używany zarówno w przypadku uszkodzeń kości, jak i urazów tkanek miękkich (mięśni, ścięgien, więzadeł, kaletek maziowych, powięzi). Jest to metoda wykorzystująca sztywny przyklepiec, który ma za zadanie działać na trzy sposoby: 1) redukować mechaniczną niestabilność stawu, 2) ograniczać ekstremalne ruchy w stawie, 3) aktywować propriocepcję w obrębie stawu objętego urazem. Taping może być skutecznym sposobem profilaktyki, leczenia i fizjoterapii schorzeń i urazów w układzie ruchu, ma jednak pewne ograniczenia. Należy do nich stosunkowo krótki czas użytkowania

taśmy, która szybko traci swoje właściwości stabilizujące, oraz dość wysoki koszt jej używania. [10] Kinesiotaping w sporcie na gruncie europejskim zaistniał po raz pierwszy w roku 1998, i to właśnie sport w dużej mierze przyczynił się do popularyzacji tej metody.

Główną zaletą stosowania kinesiotapingu w sporcie jest jego wysoka skuteczność, co determinuje możliwość kontynuacji treningu pomimo zaistniałej dysfunkcji. Jest to niezwykle istotne u osób, które zawodowo zajmują się sportem, ponieważ istniejący uraz i związany z nim ból mogą być przyczyną pojawienia się zaników mięśniowych związanych z przenoszeniem obciążeń na zdrową stronę ciała lub kończynę. Stosowana równolegle z dopasowanym do potrzeb pacjenta planem fizjoterapii, aplikacja kinesiotapingu pozwala złagodzić objawy bólowe i skorygować ustawienie stawu, zabezpieczając zawodnika przed atrofią mięśniową z nieczynności. Doraźnie, w przypadku przeciążeń, wynikiem których jest obrzęk, techniki limfatyczne przynoszą pozytywne efekty w postaci zmniejszenia wysięku w stawie. W końcowym etapie rehabilitacji na plan pierwszy wysuwają się techniki zwiększające stabilność stawu, wspomagające czucie głębokie i funkcję mięśni. Kinesiotaping w sporcie może być również stosowany profilaktycznie, w celu zabezpieczenia stawów i struktur mięśniowo – powięziowych przed przeciążeniem. [9] Badania wykazały, że kinesiotaping jest skuteczną metodą w redukcji bólu podczas leczenia urazów tkanek miękkich i może być z powodzeniem stosowany jako uzupełnienie procesu usprawniania po przebytych urazach tkanek miękkich wśród sportowców. Ponadto, szybsza redukcja bólu pourazowego wpływa na szybszy powrót zawodnika do pełnej aktywności sportowej. [11]

2.2. Ortopedia i traumatologia

W schorzeniach ortopedycznych i traumatologii kinesiotaping jest stosowany jako uzupełnienie nowoczesnej, kompleksowej fizjoterapii. W dzisiejszych czasach coraz częściej dochodzi do powstawania wad postawy, które wynikają ze złych nawyków ruchowych i siedzącego trybu życia. Długotrwałe przebywanie w pozycji siedzącej, praca przy komputerze, jednostronność ruchowa (częste i długotrwałe wykonywanie podobnych czynności) prowadzą do przeciążeń mięśni grzbietu i obręczy barkowej i ich osłabienia, przy jednoczesnym wiotczeniu nieużywanych mięśni brzucha. Nadwężeniu ulegają również ścięgna mięśni przedramion (prostowników oraz zginaczy nadgarstka). Postawa ciała ulega przygarbieniu, mięśnie piersiowe przykurczają się, plecy zaokrąglają, krążki międzykręgowe ulegają obniżeniu, co z czasem prowadzi do poważniejszych zmian degeneracyjnych. Zaburzona biomechanika ciała prowadzi do powstania szeregu bolesnych dla pacjenta schorzeń – dyskopatii, rwy ramiennej, kulszowej, przeciążeniowych zespołów bólowych (łokieć tenisisty, bark golfisty). W tych często występujących jednostkach chorobowych ulgę mogą przynieść umiejętnie zastosowane, indywidualnie dobrane aplikacje

kinesiotapingu. [9] W schorzeniach kręgosłupa i grzbietu związanych z przepukliną jądra miazdzystego i dyskopatią, cele stawiane przed kinesiotapingiem to przede wszystkim redukcja bólu, normalizacja napięcia mięśniowego i poprawa gry powięziowej w obrębie tułowia. W przypadku istnienia problemu stopy opadającej, istnieje możliwość jej korekcji i mechanicznego wzmocnienia mięśni odpowiadających za wyprost w stawie skokowym. Wszystkie te cele można osiągnąć, stosując techniki mięśniowe, korekcyjne i funkcjonalne. [12] Leczenie zespołów przeciążeniowych kończyn górnych może być wspomagane za pomocą kinesiotapingu. Za cel fizjoterapii stawia się wówczas działanie przeciwbólowe, odciążenie struktur obszaru stawu, poprawę gry powięziowej oraz zmniejszenie obrzęku okolicy objętej procesem chorobowym.

Szerokie spektrum zastosowań kinesiotapingu można znaleźć w traumatologii. 'Smagnięcie biczem', uraz odcinka szyjnego kręgosłupa, będący wynikiem gwałtownego zgięcia i wyprostu tej okolicy najczęściej w wyniku wypadku komunikacyjnego, nie zawsze wymaga zaopatrzenia ortopedycznego w postaci kołnierza. Kinesiotaping może w takim przypadku pełnić funkcję wspomagającą proces powrotu do zdrowia, pod warunkiem wcześniejszego wykluczenia złamania kręgu. W tym przypadku cel stosowania metody to zwiększenie stabilizacji zewnętrznej odcinka szyjnego kręgosłupa oraz obniżenie i redukcja bólu. Przy złamaniach i różnego rodzaju urazach w obrębie układu ruchu na plan pierwszy, oprócz działania przeciwbólowego, wysuwa się możliwość uzyskania stabilizacji zewnętrznej oraz działania przeciwobrzękowego. Aplikacja limfatyczna w takich przypadkach pozwala dodatkowo na szybsze ustępowanie krwiaków. Jeżeli po urazie pozostaje blizna, która zmniejsza ruchomość i ogranicza przesuwalność powięzi, oprócz technik miękkiej terapii manualnej istnieje możliwość zastosowania kinesiotapingu w celu poprawy gry powięziowej. W przypadku powstania pourazowych skostnień wewnątrzstawowych wywołujących ból, ograniczenie zakresu ruchów w stawie, obrzęk i lokalne zmniejszenie siły mięśniowej, w kompleksowym postępowaniu fizjoterapeutycznym można również skorzystać z aplikacji wspomagających proces powrotu pacjenta do zdrowia. [12, 13]

Kolejną możliwością użycia kinesiotapingu jest wspomaganie za pomocą taśm działań wynikających z programu rehabilitacji osób z wadami postawy i schorzeniami kręgosłupa. Działanie przeciwbólowe i regulujące napięcie mięśniowe pozwalają na korzystanie z tej metody w fizjoterapii w chorobie Scheuermanna, ZZSK, plecach płaskich, okrągłych i wklęsło – wypukłych. Wykorzystanie plastrów może mieć na celu uzyskanie nowych efektów terapeutycznych bądź utrwalenie rezultatów dotychczasowej terapii. [12] Badania dotyczące wspomagania leczenia skolioz przez kinesiotaping wykazały, że wybrane techniki pozwalają na zmianę przebiegu linii stabilności oraz zrównoważenia tułowia, co znajduje odzwierciedlenie w postaci zmiany kąta talii. Ponadto, aplikacje taśm normalizujące napięcie mięśniowe i powięziowe,

zmieniają obraz postawy dziecka ze skoliozą w płaszczyźnie czołowej i strzałkowej. Pozwala to na przypuszczenie, że kinesiotaping jako metoda wykorzystująca wiele form i technik terapeutycznych, może być pomocna w realizacji programu usprawniania dzieci ze skoliozami. [14]

2.3. Neurologia

Kinesiotaping znajduje zastosowanie w terapii problemów funkcjonalnych u pacjentów, u których w wyniku udaru mózgu dochodzi do porażenia połowiczego. Rehabilitacja neurologiczna jest więc kolejnym obszarem, w którym można zastosować kinesiotaping. Porażenie połowicze stwarza u pacjenta szereg problemów funkcjonalnych, których rozwiązywanie można wspomagać za pomocą taśm terapeutycznych. W zależności od potrzeb pacjenta, zastosowanie technik oklejania jest dowolne, natomiast najczęściej stosuje się techniki korekcyjne, mięśniowe (zarówno rozluźniające, jak i stymulujące) oraz limfatyczne. Pozwalają one na wspomaganie terapii takich zaburzeń, jak spastyka, niestabilność stawu skokowego, opadanie i obrzęk stopy i dłoni, niestabilność stawu barkowego, osłabienie mięśni tułowia czy problemy funkcjonalne w obrębie twarzy. [15] Aplikacje mięśniowe i więzadłowe przyczyniają się do obniżenia napięcia spastycznego i obrzęków zastoinowych w obrębie kończyn porażonych. Ponadto badania wykazują, iż zastosowanie kinesiotapingu wpływa na poprawę wzorca chodu u osób po udarze mózgu, poddanych kompleksowej fizjoterapii. Zastosowanie indywidualnie dobranych aplikacji mięśniowych i więzadłowych ma istotny wpływ na poprawę funkcji stawu skokowego, co znajduje przełożenie na poprawę stereotypu chodu. Osiągnięte efekty to wyrównanie długości kroku, wydłużenie fazy podporowej przejmującej ciężar ciała oraz zwiększeniem prędkości chodu. [16] Znacznie lepsze efekty w fizjoterapii pacjentów po udarze mózgu uzyskuje się przy połączeniu różnych metod, np. PNF z kinesiotapingiem. Badania wykazują, że włączenie obydwu metod do programu usprawniania i równoległe ich stosowanie pozytywnie wpływa na poprawę funkcji kończyny górnej. Zaobserwowano znaczną różnicę w funkcji kończyny górnej po zastosowaniu aplikacji. Z funkcjonalnego punktu widzenia, czynność kończyny górnej w znacznej mierze zależy od równowagi pomiędzy mięśniami brzucha a krótkimi mięśniami przykręgosłupowymi, stabilizującymi kręgosłup w odcinku piersiowym i lędźwiowym. W przypadku porażenia połowiczego, równowaga ta ulega zaburzeniu, ponieważ często dochodzi do zmniejszenia aktywności tych mięśni, skutkiem czego jest hiperlordoza lędźwiowa i boczne pochylenie tułowia w stronę przeciwną do porażonej. Aplikacja kinesiotapingu, której celem jest facylitacja postawy wyprostowanej i zmniejszenie rotacji tułowia, może wspomóc prawidłowe jego ustawienie, ponadto umiejscowienie taśm w obrębie mięśni kontrolujących łopatkę pozwala na poprawę ruchomości

i stabilności w obrębie stawu barkowego. Przekłada się to bezpośrednio na poprawę funkcji kończyny górnej. [17, 18, 19]

2.4. Onkologia

W onkologii kinesiotaping stosowany jest u pacjentek po mastektomii. W wyniku usunięcia sutka wraz z węzłami pachowymi oraz często stosowanego leczenia uzupełniającego i systemowego (radioterapia, chemioterapia, hormonoterapia), w obrębie kończyny górnej po stronie operowanej dochodzi do obrzęku, będącego jedną z przyczyn ograniczenia jej sprawności. Wyraża się ona przede wszystkim w zmniejszeniu zakresu ruchów oraz spadku siły mięśniowej kończyny. Badania przeprowadzone wśród pacjentek po mastektomii wskazują na skuteczność przeciwobrzękową działania aplikacji limfatycznych. Zastosowanie technik limfatycznych może w dość znacznym stopniu (o około 25%) zmniejszyć obrzęk w obrębie kończyny górnej po stronie operowanej. Skutkiem tego jest wzrost zakresu ruchu w stawach kończyny, oraz zwiększenie siły mięśniowej, będące wynikiem normalizacji napięcia mięśniowo – powięziowego przez dedykowaną aplikację. Dzięki zastosowaniu kinesiotapingu, pacjentki zgłaszają zmniejszenie najczęstszych dolegliwości w obrębie kończyny po stronie operowanej, do których należą uczucie dyskomfortu, ciasnoty czy rozpięcia. [20, 21]

2.5. Ginekologia i położnictwo

Jednym z rozwiązań problemów związanych z dolegliwościami bólowymi i obrzękami limfatycznymi, towarzyszącymi kobietom w ostatnich miesiącach ciąży, jest kinesiotaping. Stosowane techniki, poprzez oddziaływanie na powięzi, mięśnie oraz więzadła, mogą korzystnie wpływać na zmniejszenie niepożądanych zaburzeń z zakresu biomechaniki zmienionego przez ciążę organizmu. Odpowiednia aplikacja plastrów powoduje zarówno subiektywne zmniejszenie bólesności okolicy lędźwiowo – krzyżowej, jak i obiektywne zmniejszenie obwodów kończyn dolnych w porównaniu do stanu sprzed aplikacji, co świadczy o skuteczności metody. Jedną z jej podstawowych zalet jest brak inwazyjności. Plastry właściwościami fizycznymi zbliżone są do skóry, co pozwala na ich proste i bezpieczne zastosowanie u kobiet w ciąży. Są one antyalergiczne, a odpowiednia budowa powoduje tworzenie pozytywnej informacji czuciowej poprzez skórę i receptory. Co więcej, plastry są łatwo akceptowane przez przyszłe matki, gdyż nie ograniczają możliwości wykonywania czynności życia codziennego. Pozwala to na utrzymanie efektu terapeutycznego przez 24 godziny na dobę, przez okres od kilku dni do kilku tygodni, stając się przez to metodą oszczędną i wykluczającą dodatkowe zagrożenia. Istotna jest również możliwość indywidualnego podejścia do problemów i potrzeb każdej kobiety w ciąży poprzez dopasowywanie dostępnych technik do istniejących dolegliwości. [5, 22, 23, 24]

Wśród wielu dostępnych aplikacji kinesiotapingu, u kobiet w ciąży najczęściej wykorzystuje się te, które pomagają przyszłym matkom lepiej znosić dolegliwości wynikające ze zwiększonego obciążenia układu ruchu. Metoda może być czynnikiem wspomagającym pracę mięśni brzucha. Dzięki odpowiedniej aplikacji plastra istnieje możliwość, w zależności od potrzeb kobiety, zwiększenia bądź zmniejszenia napięcia mięśnia prostego brzucha i mięśni skośnych zewnętrznych oraz wewnętrznych. Skutkiem odpowiednio dobranej aplikacji będzie przywrócenie działania tych mięśni jako 'gorsetu', utrzymującego prawidłową postawę i zapobiegającego bólom krzyża. Ponadto, kinesiotaping będzie w tym przypadku działał jako zabezpieczenie przed nadmiernym rozciąganiem skóry i powstawaniem rozstępów. Równolegle z umieszczeniem plastrów w obszarze brzucha, często stosuje się aplikacje okolicy lędźwiowo – krzyżowej, mające na celu stabilizację i wspomaganie mięśni i więzadeł. Dzięki takiemu działaniu uzyskujemy symetryczne wyrównanie napięcia mięśni prostowników kręgosłupa. Aplikacja obejmująca stawy krzyżowo – biodrowe wywoła stabilizację tego obszaru i usprawnienie przepływu limfy. Zastosowanie obydwu aplikacji wpłynie na zmniejszenie odczuwalnego bólu. W trzecim trymestrze ciąży, wiele kobiet odczuwa dyskomfort związany z uciskiem powiększającej się macicy na przeponę. Rosnący płód zmniejsza możliwości swobodnego przemieszczania się tego mięśnia, i w konsekwencji powoduje trudności w oddychaniu. Ucisk na bogato unerwioną przeponę powoduje ból jej samej, jak również duże prawdopodobieństwo odczuwania dolegliwości w obrębie żeber, a nawet obręczy barkowej. Prawidłowo wykonana aplikacja zmniejsza ból i ułatwia oddychanie. Kinesiotaping oferuje również bezpieczne sposoby radzenia sobie z obrzękami limfatycznymi kończyn, szczególnie kończyn dolnych, będącymi częstym problemem kobiet w ciąży. Techniki limfatyczne ułatwiają odpływ chłonki ze wspomnianych rejonów, dzięki zmniejszeniu nacisku skóry i powięzi na naczynia i przewody chłonne. Zmniejszenie obrzęków poprawia komfort funkcjonowania przyszłych matek. [1, 5, 23, 24, 25]

2.6. Pediatria

Kinesiotaping znajduje również zastosowanie w pediatrii, stwarzając szereg możliwości rozszerzenia standardowej terapii o nowe oddziaływania. W terapii dziecka z opóźnieniem ruchowym, istnieje możliwość zastosowania plastrów w połączeniu z metodami neurofizjologicznymi, na przykład NDT – Bobath. Dobrana indywidualnie do potrzeb pacjenta aplikacja kinesiotapingu z powodzeniem może wspomagać u dziecka funkcje podporowe czy zmniejszać bądź zwiększać napięcie mięśniowe, w sposób istotny wpływając na wygaszanie patologicznych odruchów neurologicznych, przez co wspomagany jest rozwój dziecka. Sterowanie napięciem mięśniowym dziecka bezpośrednio przekłada się

na tworzenie nowych możliwości lokomocji. Metoda daje również możliwość zmniejszania obrzęków i parestezji. [26, 27]

Fizjoterapia schorzeń reumatycznych w pediatrii może być także wspomagana przez odpowiednio dobrane sposoby aplikacji kinesiotapingu, bez względu na wiek i wcześniejsze leczenie pacjenta. W przebiegu chorób reumatycznych w wieku rozwojowym dochodzi do powstawania w układzie ruchu stanu zapalnego, będącego przyczyną przewlekłego i nawracającego bólu. Toczący się stan zapalny sprzyja destrukcji elementów czynnych i biernych stawów. Kinesiotaping w przypadku chorób reumatycznych ma za zadanie wspierać funkcję stawów objętych procesem zapalnym, dzięki poprawie czucia głębokiego, korekcji ich ustawienia oraz regulacji napięcia mięśni, co w znacznym stopniu wpływa na zmniejszenie bólu. Aplikacja taśm terapeutycznych może być również pomocna, gdy zachodzi potrzeba przywrócenia utraconych funkcji. Poprawa możliwości lokomocyjnych dzieci, u których stosuje się oklejanie, stanowi istotne wsparcie kompleksowej fizjoterapii. Co istotne, nie ma przeciwwskazań do łączenia kinesiotapingu z innymi metodami, a metoda jest łatwo akceptowana zarówno przez dzieci, jak i rodziców. [26, 28]

3. Podsumowanie

Kinesiotaping jest stosowany od kilkudziesięciu lat jako sposób leczenia dolegliwości bólowych w obrębie stawów oraz mięśni, jak również w zmniejszaniu skutków urazów i przeciążeń w obrębie układu mięśniowo-szkieletowego. Metoda, której popularność i powszechność użycia rośnie, ma zarówno zwolenników, którzy uważają, że przynosi dobre efekty terapeutyczne, jak i przeciwników, twierdzących, że wykorzystanie plastrów nie jest poparte publikacjami wyników opartych na realnych dowodach naukowych. Przedstawione w pracy możliwości wykorzystania kinesiotapingu potwierdzają szerokie spektrum zastosowań metody jako elementu kompleksowej fizjoterapii w wielu specjalnościach klinicznych. Należy zaznaczyć, że kinesiotaping powinien być rozpatrywany jako wart rozważenia środek dodatkowy – wspomagający indywidualny plan rehabilitacji w wybranych przypadkach klinicznych, gdyż jako metoda samodzielna, rzadko bywa wystarczająca. Dalsze badania przyczynią się do lepszego poznania mechanizmów działania metody i umożliwią znalezienie dla niej nowych zastosowań.

Uwagi ogólne

Praca powstała z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w ramach Projektu: „Wyposażenie innowacyjnych laboratoriów prowadzących badania nad nowymi lekami stosowanymi w terapii chorób cywilizacyjnych i nowotworowych” w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007–2013, Osi priorytetowej I Nowoczesna Gospodarka, Działania I.3 Wspieranie Innowacji.

Literatura

1. Mikołajewska E.: Kinesiotaping. Rozwiązania wybranych problemów funkcjonalnych. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2011
2. Zajt-Kwiatkowska J., Rajkowska-Labon E., Skrobot W. i in.: Kinesio taping metoda wspomagająca proces usprawniania fizjoterapeutycznego – wybrane aplikacje kliniczne. Nowiny Lekarskie 2005, 74, 2, 190–194.
3. Bassett K.T., Lingman S.A., Ellis R.F.: The use and treatment efficacy of kinaesthetic taping for musculoskeletal conditions: a systematic review. NZ Journal of Physiotherapy, July 2010, Vol. 38 (2), p. 56 – 62.
4. Thelen M., Dauber J., Stoneman P. (2008): Clinical efficacy of kinesio tape for shoulder pain: A randomized, double-blinded, clinical trial. Journal of Orthopaedic and Sports Physical Therapy 38: 389–395.
5. Kase K, Wallis J, Kase T. Clinical Therapeutic Applications of the Kinesio Taping Method. Ken Ikai Co. Ltd: Tokyo, Japan 2003.
6. Kahanov L. (2007): Kinesio taping, Part 1: An overview of its use in athletes. Athletic Therapy Today 12: p.17–18.
7. Murray HM (2000): Kinesio taping, muscle strength and ROM after ACL repair. Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy 30:A–14.
8. Śliwiński Z., Senderek T.: Kinezjotaping – nowa metoda leczenia? Rehabilitacja w Praktyce, 3/2007, s. 18 – 20.
9. Tiffert M.: "Kinesiology taping" – teoria, metodyka, przykładowe aplikacje w konkretnych dysfunkcjach poparte przykładami ze świata sportu i nie tylko. Praktyczna Fizjoterapia i Rehabilitacja, nr 2/2010.
10. Tomaszewski W., Piątkowski M.: Taping w profilaktyce, leczeniu i rehabilitacji schorzeń i urazów narządu ruchu. Warszawa 1997, wydanie pierwsze, Agencja Wydawnicza Medsportpress.
11. Ostiak W., Peretiatkowicz A., Krystkowiak I.: Skuteczność kinesiotapingu w leczeniu urazów tkanek miękkich u młodych sportowców. Postępy Nauk Medycznych 6, s. 501–507
12. Mikołajewska E.: 47 gotowych przykładów aplikacji kinesiotaping w schorzeniach w obrębie kręgosłupa i grzbietu. Praktyczna Fizjoterapia i Rehabilitacja, 2012, 25: 4–14.
13. Mikołajewska E.: Kinesiotaping w terapii wybranych schorzeń stawu łokciowego: przykłady aplikacji. Praktyczna Fizjoterapia i Rehabilitacja, 2012; 28: 10–17.
14. Śliwiński Z., Kufel W., Halat B.: Zmiany kąta talii u dzieci ze skoliozą po aplikacjach kinesiotapingu”, materiały z sympozjum naukowego „Życie bez bólu”, Zgorzelec, 16–17 marzec 2007.
15. Mikołajewska E.: Kinesiotaping u pacjentów z niedowładem połowicznym. Praktyczna Fizjoterapia i Rehabilitacja, 2011, 19: 33–37.

16. Michalak B., Halat B., Kufel W. i in.: Ocena stereotypu chodu po zastosowaniu Kinesiology Tapingu u pacjentów po udarze mózgu. *Fizjoterapia Polska* 2009; 9, 2: p.133 – 142.
17. Guzik A.: Nowe kierunki w fizjoterapii osób po udarze mózgu. *Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego i Narodowego Instytutu Leków w Warszawie*, Rzeszów 2010, 4, 401 – 409.
18. Śliwiński Z., Kopa M., Halat B. i in.: Ocena przydatności aplikacji Kinesiology Taping u chorych po udarze mózgu usprawnianych metodą PNF. *Doniesienie wstępne. Fizjoterapia Polska* 2008; 8, 3: 325 – 334.
19. Jaraczewska E., Long C.: Kinesio® Taping in stroke: improving functional use of the upper extremity in hemiplegia. *Top Stroke Rehabilitation* 2006, 13(3), s. 31– 42.
20. Lipińska A., Śliwiński Z., Kiebzak W. i in.: Wpływ aplikacji kinesiotapingu na obrzęk limfatyczny kończyny górnej u kobiet po mastektomii. *Fizjoterapia Polska* 2007: 3(4), vol. 7, s. 258 – 269.
21. Kaya E., Kaplan C., Dandin O.: Kinesiotaping for breast cancer related lymphodema. *The Journal of Breast Health* 2012, vol. 8, nr 4, s. 166 – 168.
22. Senderek T., Breitenbach S., Hałas I.: Kinesiotaping– nowe możliwości fizjoterapii kobiet w czasie ciąży. *Fizjoterapia Polska*, vol. 5, Nr 2, 2005.
23. Słoniak R., Tittinger T.: Taping rehabilitacyjny. Taping w rehabilitacji i sporcie. *Fizjoterapia Rafał Słoniak*, Rzeszów 2011.
24. www.athletictapeinfo.com/?s=pregnancy&x=0&y=0 dostęp 16.02.13 godz. 23.22
25. www.fizjoterapia.pl/raquo-zastosowanie,1381 dostęp 16.02.13 godz. 23.30
26. Mikołajewska E.: Dziecko z obniżonym napięciem mięśniowym a kinesiotaping – opis przypadku. *Praktyczna fizjoterapia i rehabilitacja*. Styczeń 2013, nr 35, s. 53
27. Śliwiński Z., Halat B., Kufel W. i in.: Wpływ aplikacji kinesiotapingu na zmiany motoryki u dzieci z wadami rozwojowymi. *Fizjoterapia Polska* 2007, 7(1): 52–62
28. Żuk B., Księżopolska – Orłowska K.: Przydatność metody Kinesio Taping w chorobach zapalnych układu ruchu u dzieci. *Reumatologia* 2008; 46, 6: 340–347.

**Recenzent pracy: dr hab. n. med. Janusz Kocki, Uniwersytet
Medyczny w Lublinie**

Kinesiotaping w kompleksowej fizjoterapii

Streszczenie

Kinesiotaping to metoda, której popularność zarówno wśród personelu medycznego, jak i pacjentów, wzrasta. Początkowo metoda znajdowała zastosowanie głównie w medycynie sportowej, z czasem zaistniała również w takich specjalnościach klinicznych, jak ortopedia, traumatologia, chirurgia narządu ruchu, neurologia, onkologia, ginekologia i położnictwo czy pediatria. Kinesiotaping polega na umieszczaniu na skórze pacjenta zaprojektowanych w tym celu plastrów, naklejanych w różny sposób w zależności od założonego celu terapeutycznego. Metoda może działać bezpośrednio na mięśnie (normalizując napięcie mięśniowe), więzadła i powięzi. Sposób aplikacji warunkuje również działanie stabilizujące, korekcyjne, limfatyczne oraz funkcjonalne. Kinesiotaping niesie ze sobą wiele możliwości oddziaływania i stanowi cenne uzupełnienie metod stosowanych w fizjoterapii.

Słowa Kluczowe: Kinesiotaping, Fizjoterapia, Rehabilitacja, Taping

Kinesiotaping in complex physiotherapy

Abstract

Kinesiotaping is the method, which popularity increases among medical staff as well as patients. Initially, the method had been used in sports medicine, over time it arised also in such clinical specialties, as orthopedics, traumatology, musculoskeletal surgery, neurology, oncology, gynecology and obstetrics, and pediatry. In kinesiotaping it is essential to put on patient's skin the tapes, specially designed for the method, in the manner dependent on the assumed treatment targets. The method can act directly on the muscles (normalizing muscle's tension), ligaments and fascias. Applications manner contributes to stabilizing, corrective, lymphatic and functional action. Kinesiotaping creates many opportunities of therapeutic influence and comprises valuable addendum of methods used in physiotherapy.

Keywords: Kinesiotaping, Physiotherapy, Rehabilitation, Taping

Autorzy pracy: mgr Ewa Kołodziej

*mgr Dorota Kołodziej, lek. med. Lidia Kotuła, mgr Sylwia Kielbasa, lek. med.
Jolanta Karwat, lek. med. Paulina Gil – Kulik*

Adres e – mail: kolodziej_ewa@wp.pl

*Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Genetyki Klinicznej Uniwersytetu
Medycznego w Lublinie, Wydział Pielęgniarstwa i Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet
Medyczny w Lublinie*

Kwas foliowy – skutki błędnej suplementacji, wady cewy nerwowej

Wstęp

Kwas foliowy (folacyna, witamina B₉, witamina M, witamina B₁₁) to organiczny związek chemiczny, który należy do grupy witamin B. Jego nazwa pochodzi od łacińskiego słowa folium oznaczającego "liść". Termin witamina B₉ utożsamia się z całą grupą związków (ustalono, że może istnieć teoretycznie ok. 150 rozmaitych form kwasu foliowego; w przyrodzie jest ich nieco mniej, bo około 20 rodzajów). Najbardziej aktywną formą jest kwas lewomefoliowy (5-MTHF).

Związki te charakteryzują się podobną aktywnością biologiczną. Kwas foliowy jest najbardziej stabilnym i najlepiej przyswajalnym związkiem z tej grupy. Rzadko występuje w żywności, jest natomiast często stosowany jako lek, suplement, a także jako składnik dodawany do produktów spożywczych w celu ich wzbogacania [1]. Związki te są wrażliwe na działanie wysokiej temperatury, promieni słonecznych oraz kwasowość środowiska. Podczas przechowywania ulegają utlenieniu do mniej przyswajalnych pochodnych. Gotowanie powoduje straty folianów rzędu 50–90% ich zawartości wyjściowej [2]. Wielkość zapotrzebowania na foliany jest bardzo trudno ocenić. Zaleca się spożywanie 180–200 mg na dobę przez osoby dorosłe, natomiast kobiety ciężarne powinny spożywać 400 mg folianów na dobę. Według polskich norm zalecane spożycie folianów dla osób dorosłych wynosi od 280 do 340 µg dziennie, w zależności od płci, wieku i aktywności fizycznej. W Stanach Zjednoczonych Ameryki zalecane dzienne spożycie jest większe i wynosi 400 µg dziennie [3].

Kwas foliowy jest substancją egzogenną, musi być dostarczony z pożywieniem, gdyż sam organizm nie potrafi go wytworzyć. W organizmie człowieka może być jedynie syntezowany przez bakterie jelitowe. Większość folianów organizm człowieka przyswaja jednak z żywności. Foliały występują w większości produktów spożywczych, zarówno pochodzenia roślinnego jak i zwierzęcego. Znajdują się w liściastych warzywach, (np. w szpinaku, ale także w sałacie, kapuście, brokułach, szparagach, kalafiorze, brukselce) oraz w mniejszych ilościach w pomidorach, grochu, fasoli, soczewicy, soi, burakach, orzechach, słoneczniku, drożdżach piwnych, wątrobie, żółtku jaja, pszenicy, bananach i awokado. Przeciętna dieta dorosłego człowieka pokrywa do 50%

¹Email: jan.sobstyl@gmail.com Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Studencki Koło Naukowe Genetyki Klinicznej

²Email: janiecpaulina02@gmail.com Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Anglojęzycznym, Studencki Koło Naukowe Genetyki Klinicznej

dobowego zapotrzebowania na kwas foliowy. Bogate w kwas foliowy są także: sok z pomarańczy, cykoria, groszek cukrowy, rzepa, pszenica i zarodki ziaren pszenicy. Przy przygotowywaniu posiłków należy pamiętać, aby warzywa były gotowane krótko, gdyż długie gotowanie niszczy wiele witamin [4]. W wielu krajach (np. Stany Zjednoczone Ameryki Północnej), ale nie w Polsce kwasem foliowym wzbogaca się chleb.

1. Znaczenie folianów w procesach biochemicznych

Kwas foliowy, podobnie jak inne witaminy, pełni w organizmie wiele ważnych funkcji. Kwas foliowy reguluje wzrost i funkcjonowanie komórek, bierze udział w syntezie kwasów nukleinowych, czyli materiału genetycznego komórek, co czyni go niezbędnym w procesie wzrostu i rozmnażania. Uczestniczy w produkowaniu hormonu szczęścia – serotoniny, czyli wpływa na ludzki system nerwowy, w syntezie noradrenaliny aktywizującej nasz organizm oraz bierze udział w tworzeniu czerwonych krwinek – zapobieganie anemii [5]. Wpływa na poziom homocysteiny, tj. aminokwasu, od którego zależy nasze zdrowie, zapobiega chorobom serca, wylewom, zakrzepom żylnym [6]. W układzie pokarmowym pomaga w sprawnym funkcjonowaniu wątroby (jako kofaktor enzymów), jelit i żołądka oraz tworzy sok żołądkowy. Ponadto kwas foliowy zmniejsza ryzyko wystąpienia raka jelita grubego (okrężnicy), żołądka, szyjki macicy, raka płuc, trzustki, przełyku, żołądka, szyjki macicy, jajnika i sutka, a także nerwiaka niedojrzałego i białaczki [7]. Działa uspokajająco i kojąco na zmysły. Pomaga radzić sobie ze stresem. W okresie płodowym reguluje rozwój komórek nerwowych. Osoby o mniejszym stężeniu kwasu foliowego we krwi łatwiej i częściej popadają w depresję. Jeśli nie przyjmujemy odpowiedniej porcji aktywnych biologicznie folianów może dojść do zahamowania wzrostu i odbudowy komórek w organizmie (powstają stany zapalne języka oraz błony śluzowej warg), anemii megaloblastycznej (makrocytowej), czyli małej ilości czerwonych ciałek we krwi. Skutkiem tego może być uczucie przemęczenia, kłopoty z koncentracją, stany niepokoju, lęku, depresja, nadmierna drażliwość, bezsenność, roztargnienie oraz problemy z pamięcią [8,10]. Dodatkowo mogą pojawić się zaburzenia w trawieniu i we wchłanianiu składników odżywczych, niedożywienie, biegunka, zmniejszony apetyt, obniżona masa ciała, uczucie kołatania serca, przedwczesna siwizna u dzieci i młodzieży zahamowanie wzrostu. Niestety nadmiar folianów też może powodować niekorzystne skutki dla organizmu: bezsenność, rozdrażnienie, depresję, zaburzenia żołądkowo-jelitowe, skórne reakcje alergiczne (wysypka, zaczerwienienie, swędzenie), w rzadkich przypadkach skurcz oskrzeli. Ponadto nadmiar kwasu foliowego w czasie ciąży zwiększa ryzyko zachorowania przez dziecko na astmę. Należy jednak pamiętać, że dużo częściej występuje niedobór niż nadmiar, ponieważ kwas foliowy jest substancją rozpuszczalną w wodzie i jego nadmiar jest wydalany przez nerki. Nie tylko spożywanie kwasu

foliowego jest ważne. Istotną rolę odgrywa też wchłanianie tej witaminy ze światła przewodu pokarmowego. Dzięki takim substancjom, jak kompleks witamin z grupy B: witamina B6, kwas para-aminobenzoowy (PABA), witamina B12, witamina H oraz witamina C, możemy zoptymalizować ten proces. Istnieją też czynniki pogarszające wchłanianie: światło (część folianów jest rozkładana pod wpływem światła), alkohol, wysoka temperatura oraz hormonalne środki antykoncepcyjne.

2. Kwas foliowy w ciąży

Badania naukowe w wielu ośrodkach na świecie potwierdziły rolę kwasu foliowego w 70% redukcji wad cewy nerwowej. Każda kobieta, która planuje zajść w ciążę lub już stara się o dziecko powinna przyjmować profilaktycznie dawkę 0,4 mg kwasu foliowego dziennie (czyli jeszcze w okresie przedkoncepcyjnym) [11]. Prawidłowy poziom kwasu foliowego w organizmie kobiety jest niezwykle istotny, zwłaszcza dla przyszłych matek oraz ich nienarodzonych dzieci. Należy zaznaczyć że około 50% ciąż w Polsce jest nieplanowanych, więc każda kobieta prowadząca aktywne życie seksualne powinna suplementować witaminę B11. Z tego powodu zaleca się suplementację odpowiedniej dawki kwasu foliowego wszystkim kobietom, które planują ciążę – przede wszystkim ze względu na jego znaczenie w profilaktyce wad cewy nerwowej u płodu.

Do wad cewy nerwowej zaliczane są różne postacie kliniczne wad ośrodkowego układu nerwowego, które powstają w wyniku zaburzenia procesu zamykania się cewy nerwowej. Zaburzenie to w obrębie głowowego odcinka cewy jest przyczyną bezmózgowia i przepuklin mózgowych. Jeśli natomiast dotyczy dolnego odcinka cewy nerwowej, to prowadzi do powstawania przepuklin rdzeniowych. Do wad tych należą bezmózgowie, rozszczep kręgosłupa, przepuklina oponowo-rdzeniowa. Wady cewy nerwowej powstają podczas pierwszych czterech tygodni życia płodowego, kiedy kobieta bardzo często nie wie jeszcze, że jest w ciąży. Wady cewy nerwowej są wynikiem zaburzenia w przekształcaniu się rynienki nerwowej w cewę. Prawidłowe zamknięcie się rynienki następuje w 25 dniu–zamknięcie otworu przedniego oraz w 27 dniu–zamknięcie otworu tylnego. Z 2/3 przednich cewy powstaje mózg natomiast z tylnej 1/3 rdzeń kręgowy. Najwięcej wad lokalizuje się w odcinku lędźwiowo– krzyżowym kręgosłupa. Rozszczep kręgosłupa może być torbielowaty lub zamknięty. W przypadku torbielowatego rozszczepu kręgosłupa widoczna jest cysta, zawierająca płyn mózgowo-rdzeniowy (przepuklina oponowa) lub płyn mózgowo-rdzeniowy oraz rdzeń kręgowy (przepuklina oponowo-rdzeniowa). Wady dotyczące mózgowia zazwyczaj są letalne. Dziecko rodzi się martwe lub umiera szybko po porodzie. Urodzenie się dziecka z wadą jest jednoznaczne z rozpoznaniem rodziny zwiększonego ryzyka genetycznego. Ryzyko wystąpienia wady u każdego kolejnego dziecka wynosi około 4% i rośnie w miarę pojawiania się nowych przypadków wad u kolejnych członków potomstwa (po urodzeniu dwojga dzieci z WCN ryzyko to przekracza 10%).

Kwas foliowy w ciąży pomaga zapobiegać niedokrwistości (anemii) ciężarnych. Niedobór kwasu foliowego podczas ciąży stwarza również inne niebezpieczeństwa. Małe jego spożycie wiąże się ze zwiększonym prawdopodobieństwem wystąpienia przedwczesnego porodu i urodzenia dziecka z małą masą urodzeniową.

Prawidłowa podaż kwasu foliowego jest niezwykle istotna u kobiet w okresie ciąży. W celu profilaktyki wad cewy nerwowej u płodu, zaleca się przyjmowanie 0,4 mg kwasu foliowego dziennie, przez okres począwszy od trzech miesięcy przed planowaną ciążą, aż do 12 tygodnia ciąży. W praktyce, ze względu na duży odsetek ciąż nieplanowanych, zaleca się, aby wszystkie kobiety w wieku rozrodczym, przyjmowały stale doustną suplementację kwasu foliowego w dawce 0,4 mg. U kobiet, które urodziły już jedno dziecko z wadą cewy nerwowej, zaleca się profilaktykę dawką 5 mg kwasu foliowego na dobę. Panie, które przyjmują leki przeciwpadaczkowe (kwas walproinowy) powinny otrzymywać 1,0 mg kwasu foliowego dziennie. W trakcie ciąży zapotrzebowanie na witaminę wzrasta nawet czterokrotnie.

Kwas foliowy można przyjmować z preparatami multiwitaminowymi zawierającymi odpowiednią ilość kwasu foliowego. Preparaty te można kupić w aptece bez recepty. Można też spożywać płatki zbożowe wzbogacone w kwas foliowy. Przyjmowanie przez kobiety z obciążeniami genetycznymi 4,0 mg kwasu foliowego codziennie przez miesiąc przed spodziewanym zapłodnieniem i przez 3 pierwsze miesiące ciąży zmniejsza ryzyko wystąpienia wad cewy nerwowej u płodu o 75%.

Trudno jest jednak przekonać młode kobiety, które czują się zdrowo i nie planują ciąży do działań profilaktycznych. Stąd w Polsce rodzi się 1–2 dzieci z wadami układu nerwowego na 1000 żywych urodzeń. Ponadto 90% dzieci z wadą rodzi się zdrowym matkom i w rodzinach, w których nigdy wcześniej taka wada nie wystąpiła. Bezmózgowie jest wadą letalną czyli śmiertelną. Przepukliny rdzeniowe stanowią przyczynę wczesnej umieralności dzieci. Interwencja chirurgiczna w przypadku „otwartych” przepuklin rdzeniowych sprawia, że ok. 40% dzieci przeżywa 7 lat, lecz tylko 1% z nich nie wykazuje cech kalectwa. Polska należy do krajów o największym współczynniku zgonów z powodu rozszczepu kręgosłupa i wodogłowia. Wady cewy nerwowej stanowią istotną przyczynę umieralności okołoporodowej dzieci i umieralności niemowląt. Ponieważ efekty leczenia chirurgicznego są ograniczone, sprawą najistotniejszą jest profilaktyka pierwotna tych wad.

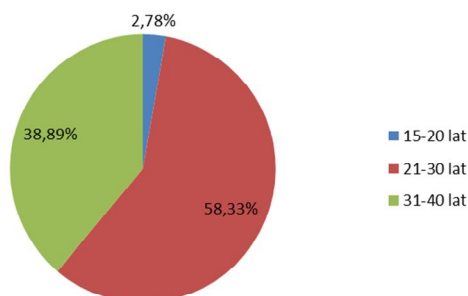
2.1. Badanie

Praca zawiera wyniki badania przeprowadzonego metodą ankietową. Ankieta składała się 20 pytań. Do badania włączono kobiety ciężarne hospitalizowane w latach 2012–2013 w Klinice Położnictwa i Patologii Ciąży w Samodzielnym Publicznym Szpitalu Klinicznym nr 1 w Lublinie. Wśród 72 ankietowanych

większość (42 ciężarne) mieściła się w przedziale wiekowym od 21–30 roku życia, 28 ankietowanych była w wieku od 31–40 roku życia, dwie ciężarne było w wieku od 15–20 roku życia. Ankieta była skierowana do kobiet w wieku rozrodczym, w celu ukazania świadomości kobiet na temat profilaktyki wad cewy nerwowej. Wśród 42 kobiet w wieku od 21–30 roku życia 35 z nich podaje, że ciąża była planowana, natomiast tylko 25 z nich suplementowała kwas foliowy przed ciążą, każda z 35 pań spożywała kwas foliowy w ciąży. Wśród tej grupy wiekowej 15 kobiet nie wie jaką dawkę kwasu foliowego powinna spożywać. Większość ankietowanych wie, że kwas foliowy ma największy wpływ na pierwszy trymestr ciąży, tylko 3 ankietowane uważają, że kwas foliowy jest ważny zarówno w I, II jak i III trymestrze ciąży. W tej grupie wiekowej 34 ankietowane wiąże brak lub nieprawidłową suplementację kwasu foliowego w ciąży z ryzykiem rozwoju wad cewy nerwowej u dziecka, 3 ankietowane uważają, że kwas foliowy niezbędny jest w zapobieganiu rozwojowi anemii u kobiety ciężarnej. Dwie ankietowane uważają, że spożywanie kwasu foliowego w ciąży ma uchronić dziecko przed rozwojem wad chromosomalnych typu zespołu Downa, zespołu Edwardsa a także przed autyzmem. Jedynie 3 ankietowane podają, że suplementacja kwasu foliowego chroni ciężarną przed zakażeniami wewnątrzmacicznymi.

Grupa ankietowanych w wieku 31–40 lat liczyła 28 kobiet, 16 spośród nich planowało ciążę, 12 – ciąży nie planowało. 4 kobiety, które planowały zajście w ciążę, nie spożywały kwasu foliowego przed ciążą, dla każdej z nich to nie jest pierwsza ciąża. Prawdłowo wiążą konieczność spożywania kwasu foliowego w celu zapobiegania rozwojowi wad cewy nerwowej u dziecka, a także wszystkie wiedzą o tym, że kwas foliowy ma najważniejsze znaczenie w I trymestrze ciąży. Jedynie 8 kobiet, które planowały zajście w ciążę oraz, które spożywały kwas foliowy jeszcze w okresie przedciążowym wie jaka dawka jest zalecana w profilaktyce wad cewy nerwowej. Grupa kobiet nieplanujących zajść w ciążę liczy zaledwie 2 ciężarne, które prewencyjnie spożywały kwas foliowy w okresie prokreacyjnym, przed ciążą. Pozostałe 10 kobiet kwasu foliowego przed ciążą nie spożywały, mimo że każda z nich prawidłowo zaznaczyła w ankiecie I trymestr jako ten, w którym kwas foliowy odgrywa największe znaczenie. W tej grupie ankietowanych jedynie 4 kobiety uważają, że profilaktyczne spożywanie kwasu foliowego chroni przed występowaniem wad genetycznych tj.: zespołu Downa, zespołu Edwardsa oraz autyzmu. Pozostałe 24 ankietowane prawidłowo odpowiedziały, że profilaktyka wad cewy nerwowej wiąże się ze spożywaniem kwasu foliowego.

Ostatnia grupa badanych w wieku 15–20 liczyła tylko dwie kobiety. Jedna z nich podaje, że ciąża była planowana. Obydwie ankietowane nie spożywały kwasu foliowego przed ciążą, prawidłowo odpowiedziały, że kwas foliowy najważniejszy jest w I trymestrze ciąży oraz zapobiega rozwojowi wad cewy nerwowej.



Wykres 1. Wiek kobiet w ciąży wśród ankietowanych

Wiek	Liczba pacjentek	Ciąża planowana	Suplementacja kwasu foliowego przed ciążą	Suplementacja kwasu foliowego w ciąży	Znana prawidłowa dzienna dawka kwasu foliowego	Znany trymestr w czasie którego suplementacja jest najważniejsza	Związek suplementacji kwasu foliowego z występowaniem WCN
15–20	2	1	0	2	0	2	2
21–30	42	35	25	42	27	39	34
31–40	28	16	24	28	8	28	28
Łącznie	72%	72,22%	68,05%	100%	48,61%	95,83%	88,89%

3. Podsumowanie

Foliany pełnią istotną rolę w krwiotworzeniu oraz w metabolizmie homocysteiny i w rezultacie zapobiegają pojawieniu się wrodzonych wad cewy nerwowej i prawdopodobnie zmniejszają zagrożenie chorobami układu krążenia. Zbyt niska podaż folianów przyczynia się do ograniczenia remetylacji homocysteiny do metioniny, co skutkuje hiperhomocysteinemią [12]. Foliany są niezbędne dla prawidłowego działania ośrodkowego układu nerwowego, a ich niedobór sprzyja demencji, zaburzeniom funkcji poznawczych i depresji. Zawartość kwasu foliowego przyjmowanego z pokarmem jest niewystarczająca w okresie ciąży, dlatego suplementację powinny stosować wszystkie kobiety w wieku rozrodczym, które mogą zajść w ciążę. Dzienna dawka kwasu foliowego jaka powinna zostać przyjęta wynosi 0,4mg. Czas trwania suplementacji to minimum 3 miesiące przed zajściem w ciążę i pierwsze 12 tyg. ciąży. Ostatnio proponuje się wydłużenie czasu przyjmowania kwasu foliowego do 16 tygodni przed zajściem w ciążę lub zwiększenie dawki dobowej do 800 µg/d.

Podczas suplementacji kwasu foliowego należy pamiętać o czynnikach obniżających jego przyswajalność, między innymi są to: palenie papierosów, picie alkoholu a także leki: metformina, leki przeciwpadaczkowe, doustne hormonalne leki antykoncepcyjne, sulfonamidy oraz cytostatyki.

W świetle wyników przeprowadzonych przez nas badań, okazują się, że wszystkie kobiety w ciąży spożywały kwas foliowy. 68% ankietowanych suplementowało kwas foliowy przed ciążą. 89% kobiet wiąże prawidłowo suplementację kwasu foliowego z profilaktyką wad cewy nerwowej.

Podziękowania

Autorzy pracy pragną złożyć serdeczne podziękowania dla Prof. zw. dr hab. n. med. Anny Kwaśniewskiej (Klinika Położnictwa i Patologii Ciąży Uniwersytet Medyczny w Lublinie, SPSK nr 1), Dr n. med. Małgorzaty Sobstyl (I Katedra i Klinika Ginekologii Onkologicznej i Ginekologii Uniwersytet Medyczny w Lublinie), lek. Lidii Kotuła (Katedra Genetyki Klinicznej Uniwersytet Medyczny w Lublinie).

Literatura

1. Wartanowicz M., Ziemiański Ś.: Witaminy rozpuszczalne w wodzie. W: Normy żywienia człowieka: fizjologiczne podstawy. Ziemiański Ś. (red.), Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2001, 198–280
2. Nadolna I., Przygoda B., Troszczyńska A. i wsp.: Tabele wartości odżywczej produktów spożywczych. Witaminy. Instytut Żywności i Żywienia. Warszawa 2000
3. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, Panthotenic acid, biotin and choline. Institute of Medicine. The National Academies Press, Washington, D.C., 1998
4. Bolander–Gouaille C.: Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism (2nd ed.). Springer Verlag France 2002
5. Wagner C.: Symposium on the subcellular compartmentation of folate metabolism. J. Nutr. 1996, 126 (4 Suppl.), 1228S–1234S
6. Malinow M. R., Bostom A. G., Krauss R. M.: Homocyst(e)ine, Diet, and Cardiovascular Diseases. A Statement for Healthcare Professionals From the Nutrition Committee, American Heart Association A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. Circulation 1999, 99 (1), 178–182
7. Kim Y. I.: Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? American Journal of Clinical Nutrition 2004, 80 (5), 1123–1128
8. Wright C. B., Lee H. S., Paik M. C. i wsp.: Total homocysteine and cognition in a tri-ethnic cohort: the Northern Manhattan Study. Neurology 2004, 63 (2), 254–260
9. Garcia A., Zilibbi K.: Homocysteine and cognitive function in elderly people. CMAJ 2004, 171 (8), 897–904
10. Vollset S. E., Ueland P. M.: B vitamins and cognitive function: do we need more and larger trials? Am. J. Clin. Nutr. 2005, 81 (5), 951–952
11. Kwas foliowy w fizjologii i patologii, Hanna Cieczot, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. 2008; 62: 405–419
12. Krackowska S., Suchocka Z., Pachecka J., Podwyższone stężenie homocysteiny we krwi jako wskaźnik zagrożenia zdrowia, Biul. Wydz. Farm. AMW, 2005, 3, 19–24

Recenzent pracy: dr hab. n. med. Janusz Kocki, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Kwas foliowy – skutki błędnej suplementacji, wady cewy nerwowej

Streszczenie

Kwas foliowy – witamina niezbędna do prawidłowego rozwoju CUN. W naszej prezentacji chcieliśmy przybliżyć problem właściwej suplementacji oraz skutki jakie wiążą się z jego brakiem. Program Pierwotnej Profilaktyki Wad Cewy Nerwowej wprowadzony w 1997 r. w Polsce zakłada, że każda kobieta w okresie prokreacyjnym, która może zajść w ciążę, powinna spożywać dzienną dawkę 0,4 mg. Wady cewy nerwowej powstają w I trymestrze ciąży, dlatego niezwykle ważną jest suplementacja kwasu foliowego zarówno przed jak i w czasie tego okresu. Najczęstszą wadą cewy nerwowej jest przepuklina oponowo-rdzeniowa odcinka lędźwiowo-krzyżowego prowadząca do kalectwa. Część wad jest niewykrywalna w kontrolnym badaniu USG, jakiemu powinna się poddawać każda kobieta w ciąży, co wiąże się z opóźnionym wdrożeniem specjalistycznej pomocy medycznej i większymi komplikacjami zdrowotnymi. Najcięższe wady jakimi są bezmózgowie i przepuklina czaszkowa są w większości wadami śmiertelnymi. W prezentacji przedstawione są również wyniki ankiety skierowanej do kobiet w ciąży, na temat suplementacji kwasu foliowego.

Słowa Kluczowe: kwas foliowy, profilaktyka, wady cewy nerwowej

Folic acid – consequences of the incorrect supplementation, neural tube defect

Abstract

Folic acid – the essential vitamin for the correct development of central nervous system. In our presentation we would like to bring closer the problem of appropriate supplementation and the consequences of lack of the folic acid. Primal Prevention of Neural Tube Defects Program, which started in Poland in 1997, assumes that every woman in procreative age who may become pregnant should take the daily dose of 0.4 mg folic acid. Neural tube defects arise in the first trimester of pregnancy, thus the supplementation of folic acid is incredibly important both before and during this period. Among the neural tube defects the most common is meningocele of lumbosacral spine which leads to disability. It is impossible to detect some of the defects during routine USG examination, which every pregnant woman should undergo, causing a delay in providing specialist medical assistance and more serious health complications. The most severe defects are anencephaly and encephalocele. In most cases, both these defects are lethal. We also included the results of study on 50 pregnant woman, who were given the questionnaire about the supplementation of the folic acid.

Keywords: folic acid, prophylaxis, neural tube defect

Karolina Gasińska¹, Anna Szajerska², Jerzy Bednarski³, Jan Sobstyl⁴,
Paulina Janiec⁵

Nowoczesne leczenie choroby Parkinsona – terapia genowa

Wstęp

Choroba Parkinsona (w skrócie PD – Parkinson's Disease) jest przewlekłym, postępującym schorzeniem ośrodkowego układu nerwowego. Nazwa tej choroby pochodzi od nazwiska londyńskiego lekarza – Jamesa Parkinsona, który jako pierwszy rozpoznał i opisał jej objawy. Opublikowana przez niego w 1817 roku praca pt. "An Essay on the Shaking Palsy" była punktem wyjścia dla wszystkich, późniejszych badań [1].

1. Pierwsze wzmianki

Pierwsze wzmianki o osobach cierpiących na chorobę Parkinsona pojawiły się już w egipskich papirusach pochodzących z XIII wieku przed naszą erą, a także w indyjskiej Ajurwedzie. Charakterystyczne dla pacjentów objawy zostały następnie opisane w II wieku naszej ery przez greckiego lekarza – Galena. Ich usystematyzowanie dokonał James Parkinson. Dokładniejszego przedstawienia choroby dokonał w 1884 roku Jean Martin Charcot [2].

1.1. Dane epidemiologiczne

Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) na świecie jest około 5 milionów osób z chorobą Parkinsona. U większości pierwsze objawy pojawiają się około 60. r.ż. Zdarzają się jednak przypadki zachorowania w znacznie młodszym wieku, nawet przed 21 r.ż. Częstość występowania choroby w populacji oceniana jest na około: 0,15% i zwiększa się wraz

¹karolina.gasinska@onet.eu, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Medycznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

²szajer@poczta.onet.pl, Studenckie Koło Naukowe przy II Katedrze i Klinice Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Nowotworów Układu Pokarmowego, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

³jerzybednarski@gmail.com, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

⁴jan.sobstyl@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Medycznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

⁵janiecpaulina02@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe Genetyki Medycznej przy Zakładzie Genetyki Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, II Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

z wiekiem. Wśród osób powyżej 65 r.ż. wynosi około 1,8%, natomiast powyżej 85 r.ż. 2,6%. Stwierdza się 13–19 przypadków zachorowań/100 tys. osób/rok. W Polsce rocznie na chorobę Parkinsona zapada około 8 tys. osób. Łączna liczba chorych w kraju wynosi ponad 80 tys. Mężczyźni chorują nieco częściej niż kobiety. Z powodu wydłużenia średniej długości życia w populacji, stale rośnie liczba osób z PD [3].

1.2. Etiopatogeneza

Istotą procesu patologicznego leżącego u podłoża choroby Parkinsona jest zwyrodnienie i zanik dopaminergicznych neuronów istoty czarnej śródmózgowia. Wytwarzają one neuroprzekaźnik zwany dopaminą, który odpowiedzialny jest m.in. za koordynację czynności ruchowych. Z powodu dużych zdolności kompensacyjnych mózgu, objawy choroby pojawiają dopiero wtedy, gdy zanikowi ulegnie około 80% neuronów dopaminergicznych. Dochodzi również do zaburzeń w układzie serotonergicznym, noradrenergicznym i cholinergicznym. Naturalny przebieg choroby trwa wiele lat, został podzielony i opisany przez Braak’a na sześć stadiów. W każdym z nich pojawiają się charakterystyczne neuryty Lewy’ego w obrębie wypustek komórkowych oraz ciała Lewy’ego w obrębie ciał komórek nerwowych. Występują one zarówno w ośrodkowym, jak i obwodowym układzie nerwowym. Zawierają głównie białka neurofilamentów, alfa-synukleinę i ubikwitynę. Proces neurodegeneracyjny w PD postępuje w sposób sekwencyjny, począwszy od predysponowanych miejsc w rdzeniu przedłużonym i nakrywce mostu, zajmując kolejne rejony istoty szarej. Jako pierwsze ulegają zwyrodnieniu grzbietowe jądro ruchowe nerwu błędnego, przylegająca do niego strefa siatkowata pośrednia oraz opuszka węchowa (stadium 1). Zwyrodnienie pojawia się również w niektórych neuronach układu autonomicznego, np. w neuronach splotu Auerbacha. W kolejnym przedobjawowym etapie zmiany nasilają się i obejmują jądra szwu, jądro siatkowate olbrzymiokomórkowe oraz jądro miejsca sinawego (stadium 2). Proces patologiczny dotyczy kolejno części podstawnej śródmózgowia i przodomózgowia oraz części zbitej istoty czarnej. Równocześnie uszkodzeniu ulega ciało migdałowate, jądro konarowo-mostowe nakrywki, jądro przednie szwu i niektóre jądra podwzgórza (stadium 3). Na tym etapie, po przekroczeniu indywidualnego progu neuropatologicznego, występują pierwsze objawy choroby. W kolejnej fazie zmiany pojawiają się w korze skroniowej (stadium 4), a w końcowych stadiach (stadium 5 i 6) w całej korze nowej.

Przyczyna neurodegeneracji w chorobie Parkinsona nie została dokładnie poznana. Obecnie dominuje teoria wieloczynnikowej epigenetycznej etiologii, w której na predyspozycję genetyczną nakładają się czynniki środowiskowe. Większość przypadków to postaci sporadyczne, w których istotną rolę odgrywają: przyspieszone starzenie, substancje toksyczne, swoiste i nieswoiste

procesy zapalne układu nerwowego, stres oksydacyjny oraz dysfunkcja proteasomów. Czynniki te mogą w odmienny sposób wpływać na powstawanie choroby u poszczególnych pacjentów, co warunkuje różnorodność przebiegu klinicznego [4].

Tylko u niewielkiego odsetka pacjentów rozpoznaje się postać rodzinną choroby Parkinsona. Ostatnie badania dowodzą jednak, że czynnik genetyczny odgrywa istotną rolę w jej patogenezie. Ryzyko wystąpienia PD u krewnego pierwszego stopnia może być od 2 do 14 razy wyższe, niż w rodzinach nie dotkniętych chorobą. Stwierdzono dotychczas ponad 10 różnych, nieprawidłowych mutacji genetycznych. Są one odpowiedzialne m.in. za nieprawidłowe kodowanie alfa synukleiny i parkininy (białka strukturalne mózgu). Pacjenci o określonym rodzaju mutacji mogą mieć różny przebieg choroby, jak też odwrotnie – w tej samej postaci choroby Parkinsona mogą być obecne różne mutacje [5].

1.3. Objawy

Choroba Parkinsona rozpoczyna się najczęściej pomiędzy 55. a 65. r.ż., jednak rozpiętość wiekowa jest bardzo szeroka i sięga od 21 do 80 lat. Jednym z jej pierwszych sygnałów może być pochylenie sylwetki ciała, daszkowate ułożenie dłoni oraz zaburzenia równowagi, szczególnie przy wstawaniu i zmianie kierunku ruchu, co jest przyczyną upadków. Nieprawidłowa, zgarbiona postawa ciała przyspiesza narastające z wiekiem zmiany zwyrodnieniowe kręgosłupa. Mniej typowy początek objawia się bólem barku lub całej kończyny górnej. Stopniowo narasta pogorszenie sprawności fizycznej. Dochodzi do zubożenia i spowolnienia ruchów kończyn, pojawia się sztywność mięśni i trudności z chodzeniem, twarz pacjenta staje się maskowata, a mowa niewyraźna. W skrajnych sytuacjach chory zastyga w bezruchu i bez dodatkowej pomocy nie może ruszyć się z miejsca. Upośledzenie ruchów naprzemiennych utrudnia wykonywanie czynności wymagających częstej zmiany kierunku ruchu, na przykład obracanie przedmiotów, krojenie itp. Dotyczy to również gryzienia i żucia, co w efekcie nasila kłopoty z połykaniem. Charakterystyczne drżenie parkinsonowskie ma różny przebieg. Często jest jednym z pierwszym objawów, występuje zwykle jednostronnie, później może zanikać lub rozszerzać się na drugą połowę ciała. Przypomina ruch kręcenia pigułek lub liczenia pieniędzy. W typowych przypadkach jest najsilniejsze, kiedy ręce lub nogi pozostają w spoczynku, a zmniejsza się podczas ruchu zamierzonego lub podczas utrzymywania jakiejś pozycji. W związku z tym nie upośledza istotnie codziennych czynności, jednak u niektórych pacjentów może mieć charakter mieszany, czyli występować zarówno w spoczynku, jak i w ruchu.

Inne typowe objawy choroby Parkinsona, które często dołączają się do obrazu klinicznego pacjenta, to: depresja, lęk, zaburzenia snu, spowolnienie myślenia, osłabienie pamięci i orientacji przestrzennej, spadek ciśnienia

tętniczego, upośledzenie regulacji cieplnej ciała, zaburzenia potencji i funkcji pęcherza moczowego, zaparcia, łojotok, nadmierne ślinienie lub suchota w ustach [6].

1.4. Diagnostyka

Rozpoznanie choroby Parkinsona jest trudne, z uwagi na podobieństwo objawów klinicznych w różnych schorzeniach neurodegeneracyjnych. Jedną z metod umożliwiających weryfikację diagnozy jest podanie leku lewodopy, będącej skuteczną formą leczenia. Jeśli objawy zmniejszą się po jej zastosowaniu, pacjent prawdopodobnie ma chorobę Parkinsona. Pośmiertne badanie patomorfologiczne mózgów osób z PD ujawnia wyraźne zniszczenie istoty czarnej, która jest wyraźnie bledsza niż w warunkach prawidłowych. Pod mikroskopem widoczne są ciała Lewy'ego w cytoplazmie niektórych neuronów. Są one jednak znajdowane także wśród zdrowej populacji, tj. u 5–6% osób powyżej 40 r.ż. i wśród 10 % powyżej 80 r.ż. Ponadto tylko u 3/4 chorych z klinicznie rozpoznaną chorobą Parkinsona występują charakterystyczne zmiany neuropatologiczne [1].

1.5. Leczenie

Podstawowa terapia w chorobie Parkinsona to leczenia objawowe, do którego zaliczamy: farmakoterapię, zabiegi neurochirurgiczne, rehabilitację oraz fizykoterapię [2]. Z użyciem tych metod udaje się opóźnić rozwój choroby, wydłużyć czas życia oraz poprawić jego jakość. Niemożliwe jest jednak całkowite zatrzymanie postępu zmian neurodegeneracyjnych i ich cofnięcie. Fakt ten stał się przyczyną poszukiwania alternatywnych sposobów leczenia. Jednym z nich jest zastosowanie terapii genowej [7].

2. Terapia genowa

Terapia genowa to forma leczenia polegająca na wprowadzeniu obcych kwasów nukleinowych (DNA lub RNA) do komórek, co ma wywierać efekt terapeutyczny. Termin „terapia genowa” został wprowadzony przez Elizabeth i Wacława Szybalskich, naukowców, którzy w roku 1962 po raz pierwszy przeprowadzili transformację genetyczną komórek eukariotycznych [8].

2.1. Założenia

Terapia genowa, mimo że jest techniką bardzo nowoczesną, czerpiącą z najnowszych osiągnięć technologicznych, w swoich założeniach ma wiele wspólnego ze standardowymi metodami leczenia, np. farmakoterapią. Większość preparatów farmakologicznych zbudowanych jest na zasadzie substancja czynna/nośnik i dopiero po połączeniu tych dwóch faz uzyskać można właściwą formę leku wraz z jego właściwościami terapeutycznymi

i farmakokinetycznymi. Terapia genowa, jako technika leczenia kwasami nukleinowymi, w zasadniczej większości przypadków opiera się na tym samym układzie substancji. Kwas nukleinowy (DNA lub RNA) stanowi substancję czynną w terapii genowej, natomiast wektor (np. plazmid lub wirus) jest nośnikiem substancji, który umożliwia проникnięcie terapeutycznych genów do tkanek lub narządów. Nośnik warunkuje ekspresję insertu w miejscu docelowym oraz stanowi ochronę dla substancji terapeutycznej [8].

2.2. Metody transferu DNA do komórki

Materiał genetyczny można wprowadzić do tkanek pacjenta wykorzystując jedną z dwóch dostępnych strategii: *in vivo* lub *ex vivo*. Strategia pierwsza polega na bezpośrednim transferze DNA do komórek chorego. Preparat genowy można podać do głównych naczyń rozprowadzających krew po całym organizmie lub do konkretnego narządu lub tkanki, np. śródskórnie, dootrzewnowo, do zmiany nowotworowej. W strategii *ex vivo* komórki pobierane są z organizmu pacjenta, a następnie hodowane w laboratorium. Tam zostają one poddane transformacji i selekcji, komórki zmodyfikowane namnażają się i podaje z powrotem do organizmu. Tego typu zabiegi możliwe są tylko w przypadku komórek, które łatwo można pobrać i hodować *in vitro*, np. komórek szpiku kostnego lub komórek macierzystych krwi [9].

Bez względu jednak na zastosowaną strategię transfer kwasów nukleinowych do komórek docelowych napotyka na wiele przeszkód. Pierwszą jest transport przez błonę komórkową. Zarówno plazmalemma, jak i cząsteczki DNA i RNA mają ładunek ujemny, co w znacznym stopniu utrudnia ich zbliżenie się do siebie. Ponadto kwasy nukleinowe mają silnie hydrofilowy charakter, co całkowicie uniemożliwia ich проникnięcie do komórki na drodze fuzji z błoną lipidową. W odpowiedzi na ten problem opracowano szereg metod mających ułatwić przedostanie się genów terapeutycznych do wnętrza komórki. Metody te można podzielić na dwie grupy: wirusowe i niewirusowe. W systemie opartym na transferze genów za pomocą wirusów główną rolę odgrywają retrowirusy, adenowirusy, lentiwirusy i wirusy związane z adenowirusami. Systemy niewirusowe dotyczą transferu bądź „nagiego DNA” (np. plazmidowego), bądź DNA połączonego z nośnikiem (np. lipidowym) [8].

2.3. Systemy wirusowe

W terapii genowej opracowanej dla leczenia choroby Parkinsona wykorzystuje się nośniki wirusowe. Podstawą do powstania wirusowych systemów transformacji komórek była naturalna zdolność wirusów do wprowadzania swojego materiału genetycznego do genomu gospodarza. Z genomu wirusa usuwane są geny odpowiedzialne za wirulencję oraz część genów odpowiedzialnych za jego replikację. Jest to ważne, by wektor stosowany w leczeniu nie wywoływał niepożądanego reakcji immunologicznej oraz, by nie

namnażał się w komórkach chorego. Najbardziej pożądanym rozwiązaniem jest przekazanie genu terapeutycznego do jądra komórkowego, a następnie degradacja pozostałości wektora. Ze względu na budowę genetyczną podzielono wektory wirusowe na dwa rodzaje– rekombinowane i defektywne. Rekombinowany wektor wirusowy zawiera obcy gen w swoim genomie. Jest to możliwe dzięki rekombinacji homologicznej, która tutaj wiąże się z delecją jednego lub więcej genów wirusa odpowiedzialnych za jego replikację w organizmie nosiciela. Tego typu wektory mogą być namnażane jedynie w komórkach, które posiadają aktywne geny usunięte z wirusa. Do tego typu nośników należą adenowirusy i niektóre wektory oparte o wirusa opryszczki. Wirusowe wektory defektywne zamiast genomu wirusa posiadają w kapsydzie jedynie plazmid zawierający docelowy gen oraz sekwencje wirusowe odpowiedzialne za upakowanie DNA do kapsydu. Zatem wektory rekombinowane zachowują wiele swoich naturalnych genów, podczas gdy wektory defektywne żadnego z wyjątkiem sekwencji umożliwiających umieszczenie plazmidu w otoczce białkowej. System nośników wirusowych jest bardzo wydajny i do tej pory stosowany jest w większości przypadków, co stanowi ok. 80% wszystkich przeprowadzanych prób klinicznych terapii genowej.

Wektory retrowirusowe są jednym z najczęściej używanych narzędzi w transformacji komórek. Materiał genetyczny retrowirusów stanowi RNA, które po przedostaniu się do komórki gospodarza zostaje przepisane na DNA (w procesie odwrotnej transkrypcji), dzięki czemu ulega integracji z genomem. Skutkiem tego wektory stworzone na bazie retrowirusów warunkują stabilną ekspresję genu terapeutycznego. Ponadto wektory te łatwo się otrzymuje i modyfikuje. Integracja genów terapeutycznych z genomem chorego jest także bardzo ważna w kontekście trwałości sekwencji, gdyż chroni kwasy nukleinowe przed degradacją przez endogenne nukleazy, znajdujące się w komórkach. Do wektorów retrowirusowych można wprowadzić około 8 kb DNA. Mogą być one stosowane jedynie w strategii *ex vivo*. Podane *in vivo* są całkowicie nieskuteczne, gdyż podlegają degradacji przez układ dopełniacza. Poważnym ryzykiem związanym ze stosowaniem wektorów retrowirusowych jest mutageneza insercyjna– retrowirusy wbudowują się w regiony o dużej zawartości genów, zwłaszcza te aktywne transkrypcyjnie. Nie można w żaden sposób kontrolować, w które miejsce w genomie wbuduje się wirus. Zatem mutageneza insercyjna może spowodować szereg niekorzystnych dla komórki oraz całego organizmu skutków. Jednym z nich jest zaburzenie ważnych zachodzących w komórce procesów, a obecne w wektorze sekwencje promotorowe i wzmacniające mogą spowodować inicjację rozwoju nowotworu, jeśli znajdą się w pobliżu onkogenów. Mimo to jest to aktualnie jedna z najczęściej stosowanych strategii terapii genowej w próbach klinicznych.

Lentiwirusy należą do rodziny retrowirusów. Najbardziej znanym przedstawicielem jest wirus HIV (ludzki wirus niedoboru odporności). Ich podstawową zaletą w porównaniu z pozostałymi retrowirusami jest to, że

zakażają również komórki dzielące się. Mogą nieść w sobie insert genowy o wielkości do 8 kb. Znalazły swoje zastosowanie w technikach terapii genowej związanych z wyciszaniem ekspresji genów opartych o siRNA. Wektory oparte na lentiwirusach (najczęściej HIV-1) mają zalety zbliżone do wektorów retrowirusowych, takie jak łatwość otrzymywania, trwałość i stabilną ekspresję wprowadzonego genu, wynikająca z integracji genomu wirusa z genomem gospodarza. Dodatkową bardzo ważną zaletą wektorów lentiwirusowych jest możliwość usunięcia niemal wszystkich naturalnych genów wirusowych oraz sekwencji regulatorowych, co warunkuje wysokie bezpieczeństwo stosowania. Wielki potencjał posiada nowa generacja wektorów lentiwirusowych – wektory lentiwirusowe nieintegrujące z genomem (NILV). W założeniach mają one pozwolić na całkowite wykluczenie mutagenyzy insercyjnej i związanych z nią konsekwencji. Stworzenie tego typu nośnika informacji genetycznej umożliwiły mutacje w genie integrazy wirusów. Mutacje te powodują dezaktywację integrazy, jednocześnie nie upośledzając ani działania odwrotnej transkryptazy ani transportu kwasów nukleinowych do jądra komórkowego. W ten sposób DNA wektora funkcjonuje w jądrze w postaci episomu, utrzymując ekspresję genu terapeutycznego w tkankach i komórkach dzielących się, takich jak siatkówka, mózg, czy mięśnie. Wektory NILV pozwalają na korektę mutacji nawet w ludzkich komórkach macierzystych, nie integrując się z genomem i tym samym, wykluczając problem mutagenyzy insercyjnej [8].

3. Badania na grupie pacjentów

Jak wykazały badania opublikowane w czasopiśmie "Lancet Neurology", terapia genowa łagodzi zaburzenia ruchowe typowe dla pacjentów z chorobą Parkinsona, takie jak mimowolne drżenie kończyn, sztywność mięśni i problemy z inicjacją ruchu.

Wnioski te zostały sformułowane po analizie efektów leczenia w grupie 45 pacjentów w wieku 30–75 lat, z rozpoznaną od co najmniej 5 lat chorobą Parkinsona. 22 osoby poddano terapii genowej, natomiast 23 otrzymały placebo. Placebo polegało na przeprowadzeniu operacji symulowanej, w czasie której neurochirurdzy wykonywali małe nacięcie w czaszce pacjenta i wstrzykiwali sól fizjologiczną. W czasie właściwej terapii genowej wprowadzano przez cewnik do jądra niskowzgórzowego obu półkul mózgu liczne kopie genu terapeutycznego, kodującego dekarboksylazę kwasu glutaminowego (GAD). Enzym ten jest odpowiedzialny za syntezę kwasu gamma-aminomasłowego (GABA), który hamuje aktywność neuronów. Jego poziom wyraźnie spada w przebiegu choroby Parkinsona co przyczynia się to do nasilenia jej objawów. Wprowadzenie genu umożliwia więc zwiększenie produkcji tego neuroprzekaźnika. Jako nośnik informacji genetycznej wykorzystano wirusy, których wstrzykuje się jednorazowo około 3,5 mld. Są one pozbawione wcześniej zdolności do replikacji w organizmie człowieka.

Wyniki leczenia okazały się bardzo zadowalające. U ponad połowy chorych poddanych terapii genowej osiągnięto wyraźne zmniejszenie zaburzeń ruchowych, podczas gdy w grupie kontrolnej odsetek ten wynosił 14%.

Poprawa funkcji motorycznych była widoczna w około miesiąc po leczeniu i utrzymywała się bez zmian podczas 6 miesięcy obserwacji – jak oświadcza biorący udział w badaniach dr Michael Kaplitt z Weill Cornell Medical College w Nowym Jorku. Stopień poprawy oceniono na specjalnej skali sprawności ruchowej. Wyniósł on 23% po zastosowaniu terapii genowej i 12,7% w grupie kontrolnej [9].

Terapia genowa, jak każda inna metoda leczenia, wiąże się z ryzykiem niepowodzenia oraz działań niepożądanych [11]. Jednak jak potwierdzają naukowcy w pracy opublikowanej w czasopiśmie "Lancet Neurology", nowatorska metoda leczenia jest nie tylko skuteczna, ale także bezpieczna. Dotychczas nie stwierdzono żadnych poważnych skutków ubocznych. U niektórych pacjentów zaobserwowano jedynie niewielki ból głowy oraz wymioty [10].

4. Podsumowanie

Terapia genowa daje szansę na wyleczenie wielu chorób dotykających ludzkość, w których nieskuteczne są inne sposoby. Obecnie większość prowadzonych badań (64,6%) dotyczy jej stosowania w leczeniu nowotworów. Inne choroby, dla których próbuje się znaleźć bezpieczną i skuteczną metodę leczenia za pomocą genoterapii, są to m.in. choroby układu krążenia, dziedziczne choroby jednogenowe, choroby infekcyjne oraz neurologiczne. Najnowsza terapia genowa opracowana przez amerykańskich naukowców stanowi przełom w leczeniu choroby Parkinsona. Przeprowadzone badania wykazują, że pozwala ona zmniejszyć zaburzenia ruchowe, będące głównym objawem schorzenia. Jest zatem szansą na poprawę jakości życia dla tych, u których rozwinęła się oporność na leki lub występuje szczególnie ciężki przebieg choroby [8]. Ponadto trwają obecnie badania nad innym rodzajem terapii genowej, w której zamiast genów zwiększających produkcję GABA, wykorzystuje się czynniki wzrostu, stymulujące neurony dopaminergiczne i modyfikujące przebieg choroby. Konieczne są dalsze badania, które potwierdzą uzyskane dotychczas pozytywne wyniki. Pozwoli to na upowszechnienie zastosowanie tej metody [12].

Współczesne działania zmierzają w kierunku udoskonalania technik transferu materiału genetycznego do komórek pacjentów, aby uczynić tę metodę jak najbardziej bezpieczną i pozbawioną efektów ubocznych. Nieustanny rozwój inżynierii genetycznej pozwala sądzić, że być może w nadchodzących latach terapia genowa stanie się szeroko dostępną, bezpieczną i skuteczną formą leczenia przynajmniej części chorób, stanowiąc uzupełnienie dla metod konwencjonalnych [8].

Uwagi ogólne

Praca powstała z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w ramach Projektu: „Wyposażenie innowacyjnych laboratoriów prowadzących badania nad nowymi lekami stosowanymi w terapii chorób cywilizacyjnych i nowotworowych” w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007–2013, Osi priorytetowej I Nowoczesna Gospodarka, Działania I.3 Wspieranie Innowacji.

Literatura

1. Co to jest choroba Parkinsona? Pobrano dnia 10.05.2013 r. z sieci WWW: <http://www.zdrowie.med.pl/parkinson/choroba/#top>.
2. Choroba Parkinsona. Pobrano dnia 10.05.2013 r. z sieci WWW: <http://www.konektia.pl/artykuly/228-choroba-parkinsona>.
3. Goworek P. Choroba Parkinsona w kwiecie wieku: co dalej? Pobrano dnia 10.05.2013 r. z sieci WWW: http://zdrowie.gazeta.pl/Zdrowie/1,105806,10775063,Choroba_Parkinsona_w_kwiecie_wieku_co_dalej_.html.
4. Boczarska-Jedynak M. Choroba Parkinsona cz.1. Epidemiologia i etiopatogeneza. Pobrano dnia 10.05.2013 r. z sieci WWW: <http://www.forumneurologiczne.pl/txt/a,7416,1,0-0-1>.
5. Sienkiewicz J. Poradnik dla osób z chorobą Parkinsona. Pobrano dnia 10.05.2013 r. z sieci WWW: <http://pastylka.pl/choroby/parkinson/opis>.
6. Sienkiewicz J. Poradnik dla osób z chorobą Parkinsona. Pobrano dnia 10.05.2013 r. z sieci WWW: <http://pastylka.pl/choroby/parkinson/objawy>.
7. Worth PF. How to treat Parkinson's disease in 2013. Clin Med. 2013 Feb;13(1):93–6.
8. Maniecka M. Terapia genowa – czym jest i jej perspektywy. Pobrano dnia 10.05.2013 r. z sieci WWW: <http://laboratoria.net/pl/artukul/12555.html>.
9. Nagabhushan Kalburgi S, et al. Recent gene therapy advancements for neurological diseases. Discov Med. 2013 Feb;15(81):111–9.
10. Kaplitt M. et al. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. The Lancet. Volume 369, Issue 9579, 23–29 June 2007, Pages 2097–2105.
11. Kastory B. Zabić Parkinsona. Czy terapie genowe to szaleńczy eksperyment? Wprost. 35/2003 (1083).
12. Bjorklund T, Kordower JH. Gene therapy for Parkinson's disease. Mov Disord. 2010;25 Suppl 1:S161–73.

Pracę recenzował: dr hab. n. med. Janusz Kocki, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Nowoczesne leczenie choroby parkinsona – terapia genowa

Streszczenie

Szacuje się, że choroba Parkinsona występuje u 6,3 miliona osób na świecie i dotyczy wszystkich ras i kultur. Jej nazwa pochodzi od nazwiska londyńskiego lekarza – Jamesa Parkinsona, który jako pierwszy rozpoznał i opisał objawy tego schorzenia. Napisana przez niego w 1817 roku praca pt. "An Essay on the Shaking Palsy" była punktem wyjścia dla wszystkich, późniejszych badań. Choroba Parkinsona jest to samoistna, powoli postępująca zwyrodnieniowa choroba ośrodkowego układu nerwowego. Występuje głównie w wieku starszym, ok. 2/3 chorych ma ponad 65 lat.

Choroba Parkinsona rozwija się na skutek degeneracji neuronów w istocie czarnej, będącej częścią mózgowia. Prowadzi to do zaburzeń ruchowych, takich jak: bradykineza, sztywność mięśni, drżenie spoczynkowe, a także zmian osobowości i depresji. Dopóki objawy choroby są mniej nasilone, można je skutecznie łagodzić za pomocą leków. Jednak z czasem efekty farmakoterapii słabną i pojawiają się działania niepożądane. Stało się to przyczyną poszukiwania nowych, alternatywnych, sposobów leczenia.

Celem pracy jest przedstawienie postępu w leczeniu choroby Parkinsona. Dzięki rozwojowi nauki, możliwe stało się wykorzystanie terapii genowej. Polega ona na wprowadzaniu przez cewnik do jądra niskowzgórzowego wielu kopii genu, wbudowanego w materiał genetyczny wirusa. Gen ten koduje dekarboksylazę kwasu glutaminowego, uczestniczącą w syntezie kwasu gamma aminomasłowego. Prowadzi to do wzrostu stężenia tego neuroprzekaźnika. Przeprowadzone badania wskazują na skuteczność terapii genowej w leczeniu choroby Parkinsona. Powoduje ona złagodzenie objawów i poprawę jakości życia pacjentów. Konieczne są dalsze badania, które pozwolą udoskonalić stosowanie tej techniki.

Słowa Kluczowe: choroba Parkinsona, terapia genowa, leczenie

Modern treatment of parkinson's disease – gene therapy

Summary

It is estimated that Parkinson's disease occurs in 6,3 million of people of all races and cultures in the world. It is named after London doctor – James Parkinson who diagnosed it for the first time and described it's symptoms. His work entitled An Essay on the Shaking Palsy written in 1817 was a starting point for all further research. Parkinson's disease is idiopathic, progressive and degenerative disorder of the central nervous system. It appears mainly in elderly people and about 2/3 of diseased are over 65 years old. Parkinson's disease develops as a result of degeneration of neurons in substantia nigra which is a part of the brain. It leads to movement disorders such as bradykinesia, hypokinesia, tremor at rest, personality changes and depression. Until the symptoms are less advanced, they can be treated with the use of drugs. Although, the effects of pharmacotherapy weakens and the side effects appear with time. It was the reason to search for new, alternative methods of Parkinson's disease treatment. The aim of the work is to present the progress in Parkinson's disease treatment. It became possible to use gene therapy due to scientific development. The therapy consists in introducing many copies of gene inbuilt in genetic material of the virus to subthalamic nucleus through catheter. The gene encodes glutamic acid decarboxylase which takes part in gamma-Aminobutyric acid synthesis. The improvement of health condition was observed in patients who were subjected to the therapy. Conducted research indicate efficiency of gene therapy in Parkinson's disease. It alleviates symptoms and improves patients' quality of life. Further research which will allow to improve the usage of this technique are necessary.

Key Words: Parkinson's disease, gene therapy, treatment

Nowotworowe komórki macierzyste

1. Czym są komórki macierzyste?

Komórki macierzyste (ang. stem cells, SC), rzadziej nazywane komórkami pnia, oprócz zdolności do proliferacji (potencjalnie nieograniczonej liczby podziałów) mają też możliwość do różnicowania się w inne typy komórek. W zależności od „stopnia dojrzałości” wyróżnia się:

- totipotencjalne (różnicują się w dowolny rodzaj komórek występujący w organizmie),
- pluripotencjalne (różnicują do wszystkich komórek organizmu za wyjątkiem komórek łożyska),
- multipotencjalne (powstają z nich określone typy komórek),
- unipotencjalne (komórki prekursorowe dla określonego typu komórek).

W naturze budują one zarodki (ang. embryonic stem cells, ESC), a w dorosłych organizmach występują w bardzo małych ilościach – ich zadaniem jest uzupełnianie ubytków tkanek lub narządów [1]. SC dzielą się w sposób asymetryczny; w wyniku tego procesu powstają dwie komórki: jedna pozostaje w puli komórek macierzystych, druga natomiast ulega dalszemu różnicowaniu lub ginie na drodze apoptozy.

W obrębie dorosłego organizmu komórki macierzyste występują w niszach tkankowych lub narządowych [2]. Są to regiony macierzy zewnątrzkomórkowej, które, dzięki wydzielanym przez dojrzałe komórki cytokinom, chemokinom i czynnikom wzrostu, odpowiedzialne są za kontrolę proliferacji i różnicowania zawartych w nich komórek pnia [3]. W obrębie niszy komórki są kotwiczone przez tzw. połączenia przylegające (ang. adherens junctions) i dodatkowo utrzymywane tam za pomocą różnego rodzaju układów chemokinowych [4]. Sygnałem do uwolnienia komórek macierzystych do krwioobiegu jest zmiana stężenia liganda swoistego dla danego układu chemokinowego i ekspresji jego receptora (np. ligand SDF-1 dla receptora CXCR4). Komórki zostają wyrzucone z niszy również pod wpływem czynników regulatorowych (np. G-CSF), cyklofosfamidu czy stresu organizmu wywołanego np. zawałem mięśnia sercowego, dzięki czemu mogą odpowiednio szybko przeniknąć do krwi, dotrzeć do uszkodzonej tkanki i zapoczątkować jej regenerację [2].

¹ rodzik.olga@gmail.com, SKN Biotechnologów „Mikron” Uniwersytet Marii Curie–Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii; <http://www.binoz.umcs.lublin.pl/>

² oz113@wp.pl, SKN Biotechnologów „Mikron” Uniwersytet Marii Curie–Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii; <http://www.binoz.umcs.lublin.pl/>

2. Nowotworowe komórki macierzyste

Teorię o występowaniu komórek macierzystych w obrębie nowotworów zaproponowano już kilkadziesiąt lat temu, jednak poziom ówczesnych technik molekularnych uniemożliwił przeprowadzenie weryfikujących ją badań [5]. Najwięcej dowodów potwierdzających tę hipotezę dostarczyły badania nad chorobami krwi. Po raz pierwszy obecność CSC w przebiegu ostrej białaczki szpikowej (ang. acute myeloblastic leukemia, AML) wykryto w 1990 roku [6]. AML to grupa chorób spowodowanych rozrostem nowotworowo zmienionych krwiotwórczych komórek prekursorowych. W wyniku zaburzeń cyklu komórkowego i proliferacji, w szpiku następuje nagromadzenie niedojrzałych, nieodróżnicowanych form komórkowych, które z czasem mogą naciekać narządy [7].

Mianem CSC określa się pulę nieodróżnicowanych komórek, izolowanych z tkanki na podstawie określonych markerów (tabela nr 1).

Tabela 1. Przykłady markerów definiujących nowotworowe komórki macierzyste

Marker	Wykrywane nowotwory
CD 24	trzustki
CD 44	piersi, jelita grubego, wątroby, prostaty, jajnika, trzustki
CD 90	ostra białaczka T limfoblastyczna
CD 105	nerek
CD 133	ostra białaczka B limfoblastyczna (dzieci), jelita grubego, płuc, kości, trzustki, prostaty, glejaki i nowotwory mózgu
Bml1	mózgu, białaczki
EpCam	jelita grubego, trzustki

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [5, 10]

CSC są nieliczne: występują w proporcji 1 do 103 – 105 ze zwykłymi komórkami nowotworowymi i rzadziej od nich ulegają podziałom. Dzięki temu są odporne na konwencjonalne metody leczenia nowotworów – standardowe chemioterapeutyki niszczą większość szybko dzielących się komórek nowotworowych, pozostawiając niemal nienaruszoną populację CSC. To tłumaczy częste nawroty nowotworów, mimo początkowych obiecujących wyników zastosowanej terapii. Badania wykazały, że wystarczy już ok 100 komórek macierzystych, by odbudować całą masę guza [8].

2.1. SC nowotworowe i fizjologiczne – podobieństwa i różnice

Cechami wspólnymi CSC jak i normalnych komórek macierzystych są bez wątpienia zdolność samoodnawiania, proliferacji, specjalizacji (różnicowania) i multipotencji. Udowodniono, że czynnikiem bezpośrednio wpływającym na powyższe właściwości jest wspomniane wcześniej mikrośrodowisko nazywane

niszą. Oba typy komórek podlegają podobnym mechanizmom regulacji w obrębie niszy. Dowiedziono, że do zachowania sprawnych szlaków sygnałowych, CSC raka jelita grubego wymagają stymulacji przez czynnik wzrostu hepatocytów HGF wydzielany przez komórki mezenchymalne. Świadczy to o wpływie zdrowych komórek znajdujących się w pobliżu guza za zachowanie przez niego onkogenezy. Nisza może nie tylko utrzymywać CSC w stanie multipotencji, wpływa także bezpośrednio na odróżnicowanie komórek prawidłowych do CSC czy indukuje proces przerzutowania. Nisze CSC położone są najczęściej w pobliżu naczyń krwionośnych, co znacznie ułatwia tworzenie przerzutów. Podejrzewa się, że osiedlanie się CSC w nowych organach jest poprzedzone utworzeniem nowej niszy w miejscu przerzutu. Ma ona umożliwić rozrost wtórnych guzów w tkankach [5].

Jedną z różnic między normalnymi i nowotworowymi SC jest częstość ich występowania. Fizjologicznie prawidłowe komórki macierzyste występują w obrębie tkanki w niewielkich ilościach, CSC stanowią natomiast znaczną część komórek nowotworu (szacuje się ich ilość np. w guzie piersi na 12–60%) [9].

Tabela 2. Zestawienie cech wspólnych z prawidłowymi komórkami macierzystymi i cech swoistych dla CSC.

Właściwości CSC wspólne z prawidłowymi SC	Cechy swoiste CSC
zdolność do samoodnowy populacji komórek	zdolność samoodtworzenia guza
potencjał różnicowania (zdolność do tworzenia różnych typów komórek)	odporność na leki, wolne rodniki i radioterapię
niska aktywność proliferacyjna	lokalizacja w warstwie rozrodczej na obrzeżach guza
oporność na działanie czynników uszkadzających DNA	zdolność unikania odpowiedzi immunologicznej organizmu
swoisty fenotyp – zestaw markerów powierzchniowych	stanowią znaczną część komórek nowotworu
podobne mechanizmy regulacji	

Źródło: Opracowanie własne na podstawie [11, 12]

2.2. Proces nowotworzenia

Zgodnie z aktualną wiedzą, nowotwór jest określany mianem choroby cyklu komórkowego. Powstaje on z komórek, które zachowały zdolność do podziału (mogących wejść w cykl komórkowy) [10].

Istnieją różne teorie opisujące przebieg kancerogenezy, w ostatnich latach zaproponowano założenia uwzględniające istnienie CSC. Według koncepcji hierarchicznej tylko niewielka ilość komórek w populacji posiada zdolność

formowania guza i to właśnie te komórki są odpowiedzialne za rozwój i progresję nowotworu. Nowotworowe komórki macierzyste mogą tworzyć dowolny typ zróżnicowanych komórek, jaki można znaleźć w obrębie określonego nowotworu – istnieje zatem hierarchia różnicowania: komórka macierzysta – progenitorowa – dojrzała zróżnicowana. Za zdolność do szybkiego rozrostu tkanki nowotworowej odpowiadają komórki aktywnie proliferujące (o wyższym stopniu specjalizacji).

Inna teoria zakłada klonalną ekspansję komórki, która na skutek mutacji nabyła najkorzystniejsze cechy dla wzrostu i rozwoju nowotworu. Dzięki aktywnej proliferacji jest w stanie zdominować inne CSC w obrębie danej niszy, a jej klony stanowią znaczną większość wśród populacji komórek nowotworowych. Taki stan utrzymuje się do momentu, kiedy jedna z komórek potomnych ulegnie kolejnej mutacji, która da jej przewagę nad innymi i wtedy to ona przerośnie nowotwór. W wyniku kolejnych takich zmian CSC mogą stać się zdolne do opuszczenia swojej niszy, przeniknięcia do krwioobiegu i tworzenia przerzutów [11]. W ten proces zaangażowane są dwa typy genów: protoonkogeny i geny supresorowe. Protoonkogeny kodują białka nadzorujące przebieg replikacji DNA, proliferację i różnicowanie. Geny supresorowe (antyonkogeny) hamują wzrost komórki, stabilizują jej materiał genetyczny, regulują podziały komórkowe oraz kodują białka proapoptotyczne.

Najprawdopodobniej w czasie nowotworzenia zachodzi równoczesne występowanie zjawisk opisywanych przez obie teorie: w wyniku klonalnej ekspansji CSC ulegają selekcji, zostaje wyłoniona komórka o najkorzystniejszej kombinacji mutacji, która staje się źródłem hierarchii zróżnicowanych komórek nowotworowych [12].

Kolejnym etapem niezbędnym dla rozwoju nowotworu jest angiogeneza, czyli proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Jest ona regulowana dzięki rekrutowanym przez CSC komórkom hematopoetycznym i mezenchymalnym. W wyniku niedotlenienia zaczynają one wytwarzać czynnik HIF (ang. hipoksja inducing factor). Jego obecność inicjuje syntezę czynników proangiogennych, wśród których najważniejszym jest VEGF. Ich aktywność wywołuje tworzenie niesprawnych naczyń krwionośnych i zmienny przepływ krwi, co z kolei prowadzi do niedotlenienia. Taki stan istotnie wpływa na metabolizm komórkowy (niskie zużycie tlenu). Niedotlenienie inicjuje procesy korzystne dla dalszego rozwoju nowotworu: angiogeneza ulega nasileniu, a komórki nowotworowe nabierają zdolności do samodzielnego przemieszczania się. Wzrasta również genetyczna niestabilność komórek, co umożliwia kolejne mutacje i progresję nowotworu [13].

2.3. Oporność CSC

Konwencjonalne metody leczenia nowotworów, tj. zabiegi chirurgiczne, chemioterapie, radioterapie i immunoterapie niszczą szybko rosnące,

zróżnicowane komórki nowotworowe. Masa nowotworowa jest w większości usuwana, jednak częste nawroty choroby sugerują, że część komórek odpowiedzialnych za kancerogenezę pozostaje w organizmie pacjenta – są to mniej zróżnicowane CSC wykazujące się rzadszymi podziałami komórkowymi i większym potencjałem różnicowania [14].

Uważa się, że kluczową rolę w oporności CSC na radioterapię odgrywa sprawnie aktywowany mechanizm naprawczy DNA. Kinazy Chk1 i Chk2 powodują zatrzymanie cyklu komórkowego do momentu naprawienia DNA. Ich inhibicja zmniejsza oporność CSC na promieniowanie jonizujące [15]. Komórki te, w odróżnieniu od szybko proliferujących komórek guza aktywują szlaki PI3K/Akt i zależnie od białka p53 zatrzymują cykl komórkowy, który zostaje włączony dopiero po 72 godzinach. Uważa się, że inhibicja szlaku kinazy Akt może zwiększyć wrażliwość CSC na radioterapię i umożliwi ich eliminację na drodze apoptozy.

Oporność na leki nowotwory zawdzięczają m.in. miofibroblastom niejako „rekrutowanym” przez CSC. Są to komórki pochodzenia mezenchymalnego, które za pomocą odpowiednich substancji sygnałowych (chemokin, cytokin, prostaglandyn) zostają zmuszone przez CSC do podporządkowania się i działania na rzecz nowotworu. Dzięki wydzielanym przez miofibroblasty czynnikom, jak np. tlenek azotu (NO) czy interleukiny 1 β (IL-1 β), aktywność kaspaz biorących udział w apoptozie komórek nowotworowych ulega zahamowaniu. Inhibicja tych enzymów w komórkach zwiększa ich oporność na leki [16].

Kolejnym systemem obrony nowotworu przed prowadzoną standardową chemioterapią jest nadekspresja transmembranowych transporterów ABC – jest to tzw. oporność zależna od transportu leku. Transbłonowe białka ABC odpowiadają za zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia leku. Dzieje się tak z powodu ograniczonego napływu leku do wnętrza komórki nowotworowej, jego wyrzutu na zewnątrz, bądź też transportu w obrębie organelli komórkowych [17]. Oporność na leczenie i wyjątkowa wytrzymałość CSC wiąże się również ze zwiększoną ekspresją białek HSP (białka szoku termicznego, ang. heat shock proteins), kojarzoną ze złymi prognozami choroby. Główną funkcją tych molekuł jest ochrona innych białek, ważnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki, przed zmianami struktury wywołanymi np. denaturacją czy agregacją. Tym samym utrzymują one komórkę w fizjologicznie prawidłowym stanie i zapobiegają zainicjowaniu apoptozy [18].

Nowotwory są w stanie unikać odpowiedzi immunologicznej gospodarza lub odpowiednio ją modyfikować. Z tymi zdolnościami wiązana jest glikoproteina CD200 – marker CSC w nowotworach prostaty, mózgu, okrężnicy czy piersi. Ekspresja CD200 na powierzchni CSC prawdopodobnie wywołuje obniżenie odpowiedzi obronnej, za której regulację odpowiadają cytokiny Th1, oraz wzrost proliferacji. Przypuszcza się, że modyfikacja aktywności CD200 może poprawić efekty immunoterapii [14].

3. Nowe informacje, nowe metody leczenia omijające systemy lekooporności

Warunkiem skutecznej terapii przeciwnowotworowej jest zwalczanie zarówno zróżnicowanych komórek guza, jak i populacji CSC. Konwencjonalne terapie powodują wprawdzie redukcję masy nowotworu, jednak pozostawiają pewną pulę CSC w organizmie pacjenta. Fakt, że jest to przyczyną częstych nawrotów choroby a także uciążliwe skutki uboczne standardowych metod, były bodźcem do opracowania nowych metod leczenia. Prowadzone aktualnie badania wykorzystują najnowszą wiedzę na temat molekularnych sygnałów w CSC, ich relacji z mikrośrodowiskiem, a także coraz lepiej poznawanych mechanizmów oporności na leki.

3.1. Blokowanie kaskad sygnałowych

Opracowywane i wciąż udoskonalane strategie leczenia opierają się m.in. na blokowaniu sygnałów przekazywanych w obrębie komórki, a także między komórką a jej środowiskiem. Skutkuje to zahamowaniem proliferacji CSC oraz zatrzymaniem wzrostu zróżnicowanych komórek nowotworowych. Aby to osiągnąć, stosuje się np. niskocząsteczkowe substancje lub swoiste przeciwciała. Obiecujące wyniki wykazują klasy cząsteczek peptydowych, np. brewininy 2R, które wykazują zdolność półswoistego zabijania komórek nowotworowych, a także ukierunkowania szlaków komórkowych na śmierć komórki zamiast jej proliferację [5].

Inną potencjalną metodą walki z CSC jest indukcja podziałów i różnicowania tak, by zwiększyć wrażliwość komórek na standardową chemioterapię czy radioterapię. W przypadku nowotworów hematologicznych można zastosować kwas retinowy, który przyspiesza dojrzewanie CSC i zwiększa efektywność konwencjonalnych metod leczenia [11].

3.2. Hamowanie angiogenezy

Zahamowanie procesu tworzenia naczyń krwionośnych powoduje odcięcie nowotworu od tlenu i składników odżywczych. Jedną z koncepcji terapeutycznych zakłada, że zniszczenie niszy za pomocą leków antyangiogennych będzie wywoływać śmierć CSC (pośrednia eliminacja). W tym celu stosuje się kombinacje leków antyangiogennych z chemioterapeutykami.

Inna metoda zakłada modyfikację fenotypową komórek nowotworowych i komórek tworzących nisze poprzez ukierunkowanie ich na fenotyp antyangiogeny i immunostymulujący. Można to osiągnąć stosując leki antyangiogenne i immunostymulanty [16].

Istnieje również kilka strategii terapii genowej umożliwiających zahamowanie ekspresji genów odpowiedzialnych za tworzenie naczyń krwionośnych. Geny terapeutyczne lub związki modulujące ekspresję dostarczane są do komórek za pomocą nośników DNA: mogą być to wektory wirusowe (retro- i adenowirusy), plazmidy oraz obojętne lub kationowe liposomy [19].

3.3. Promowanie apoptozy

Zahamowanie apoptozy wydłuża okres życia komórek i zwiększa liczebność populacji wystawionej na działanie potencjalnych karcynogenów, zwiększając szansę na kolejne mutacje [10]. Proapoptotyczna terapia genowa może opierać się o dwa szlaki: wewnętrzny – i zewnętrzny pochodny.

Aktywacja wewnątrzkomórkowa opiera się na uwolnieniu cytochromu c z mitochondriów, utworzenie białkowego kompleksu – apoptosomu, i następnie aktywację kaspazy 9 i indukcję apoptozy. Zewnątrzkomórkowe szlaki są aktywowane przez membranowe receptory za pomocą swoistych ligandów. Powstający wtedy kompleks aktywuje kaspazy 8 i 10 i powoduje śmierć komórki.

Na uruchomienie procesu apoptozy nastawiona jest również molekularna chemioterapia z zastosowaniem tzw. genów samobójczych, które kodują enzymy przekształcające proleki w substancje cytotoksyczne. Utworzone w ten sposób toksyny przekazywane są komórkom ościennym, w których także indukowana jest apoptoza [19].

3.4. Genetyczna immunoterapia

Idea tej metody bazuje na wykorzystaniu układu odpornościowego do usuwania komórek nowotworowych. Do stymulacji reakcji odpornościowej wykorzystuje się cytokiny i chemokiny, np. IL–2 czy interferon (terapia pasywna). Terapia aktywna polega, z kolei, na wprowadzeniu do organizmu pacjenta szczepionki zawierającej antygeny komórkowe i pobudzeniu układu immunologicznego do niszczenia komórek nowotworowych. Przypuszczalnie, jeśli w skład szczepionki wejdą antygeny CSC, istnieje szansa na zwiększenie skuteczności tej metody i wyeliminowanie nawrotów choroby [19].

3.5. Nanotechnologie

Nanomateriały mogą być wykorzystane do opłaszczania leków, zapobiegając ich szkodliwym interakcjom w organizmie, umożliwiając ukierunkowanie transportu niesionej cząsteczki i zwiększając jej efekt terapeutyczny. Taki system opracowano do zniwelowania oporności wywołanej działalnością transbłonowych receptorów ABC w komórkach nowotworowych. W normalnych warunkach, cząsteczka leku dyfundująca do komórki zostaje rozpoznana przez receptory ABC i aktywnie usunięta na zewnątrz.

Po jej opłaszczeniu lub połączeniu ze specyficzną nanocząsteczką, wnika do komórki w pęcherzyku endocytarnym, nie zostaje od razu rozpoznana przez transportery i może pozostać w komórce na tyle długo, by zwiększyć efekt terapeutyczny i tym samym zwiększyć wydajność leczenia [14].

3.6. Terapia skojarzona

W praktyce, w celu poprawy skuteczności terapii, łączy się różne typy leczenia. Pozwala to zwiększyć wrażliwość nowotworowych komórek macierzystych i ułatwić ich usunięcie z organizmu pacjenta, a co za tym idzie – zapobiec odbudowaniu masy guza. Kolejne korzyści to zmniejszenie dawek leków przy zachowaniu efektu terapeutycznego czy redukcja skutków ubocznych.

4. Podsumowanie

Odkrycie istnienia nowotworowych komórek macierzystych znacznie zrewidowało spojrzenie naukowców i lekarzy na proces nowotworzenia. Pozwala to lepiej zrozumieć brak efektywności leczenia, tak często obserwowany w standardowych terapiach, a także daje szansę na wprowadzenie koniecznych dla zwiększenia tej efektywności modyfikacji. Dotychczas stosowane metody leczenia skierowane były na dojrzałe, zróżnicowane komórki nowotworowe, nie likwidowały natomiast CSC. Obecnie prowadzone badania ukierunkowane są na opracowanie terapii uzupełniającej, która pozwoliłaby zapobiegać mikroprzerzutowaniu i nawrotom choroby. Koniecznością jest dokładne poznanie molekularnych mechanizmów i ścieżek sygnałowych w obrębie nowotworowych komórek macierzystych. Taka wiedza da możliwość precyzyjnego blokowania szlaków sygnałowych, które warunkują zwiększoną proliferację, zahamowanie apoptozy, przerzutowanie czy nasiloną angiogenezę w obrębie nowotworu.

Dokładna charakterystyka molekularna pozwoli na selektywne niszczenie CSC, bez szkodliwego oddziaływania na fizjologicznie prawidłowe komórki organizmu pacjenta. Czynniki molekularne już w obecnym momencie mają duże znaczenie rokownicze i terapeutyczne. Uważa się, że analiza ekspresji genów pozwoli wyodrębnić nowe podtypy obecnie znanych nowotworów, a co za tym idzie – opracować dla nich skuteczną terapię celowaną.

Literatura

1. Sikora M.A., Olszewski W.L., 2004, Komórki macierzyste – biologia i zastosowanie terapeutyczne, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 58, 202–208
2. Kawiak J., 2009, Komórki macierzyste organizmu dorosłego w biologii i medycynie, *Postępy Biologii Komórki* 36 suppl. 25, 99–110
3. Kopeć-Szłęzak J., 2003, Mikrośrodowisko krwiotwórcze szpiku, *Onkologia Polska* 6(2), 71–76
4. Tutak M. i in., 2006, Tkanki zęba – potencjalne źródło komórek macierzystych; *Czasopismo Stomatologiczne*, LIX, 6, 451–457
5. Wieczorek K., Niewiarowska J., 2012, Nowotworowe komórki macierzyste, *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 66, 629–636
6. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J i wsp. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 36, 645–8

7. Hellmann A., Prejzner W., 2001, Białaczki – rozpoznawanie i leczenie, *Przewodnik lekarza* 4(10), 14–21
8. Kowalska A., Kowalik A., Telomer i telomeraza w onkogenezie, 2006, *Współczesna onkologia*, vol. 10, 485–496
9. Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F.: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 3983–3988
10. Domagała W., 2007, Molekularne podstawy karcynogenezy i ścieżki sygnałowe niektórych nowotworów ośrodkowego układu nerwowego, *Polski Przegląd Neurologiczny*, tom 3, 3, 127–141
11. Szaryńska M., Kmieć Z., 2011, Rola nowotworowych komórek macierzystych w patogenezie i terapii chorób nowotworowych, *Forum Medycyny Rodzinnej*, tom 5, nr 1, 47–56
12. Takebe N., Ivy S.P., 2010, Controversies in cancer stem cells: targeting embryonic signaling pathways. *Clin. Cancer Res.*; 16: 3106–3112.
13. Szala S., Olbryt M., 2005, Białkowe inhibitory angiogenezy w terapii nowotworów, *Współczesna Onkologia* vol. 9; 2 (48–53)
14. Statkiewicz M., Małecki M., 2009, Macierzyste komórki nowotworowe a oporność nowotworów na terapię, *Journal of Oncology*, vol. 59 Number 6, 456–463
15. Rich J.N., 2007, Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. *Cancer Res*; 67: 8980–4
16. Szala S., 2009, Angiogeneza i immunosupresja: jin i jang progresji nowotworów? *Postępy Hig Med Dośw.* (online), 63: 598–612
17. Dębska S. i in., 2011, Transportery błonowe ABC – budowa, funkcja i znaczenie w mechanizmach wytwarzania oporności wielolekowej w komórkach nowotworów złośliwych, *Postępy Hig Med Dośw.* (online); 65: 552–561
18. Kaźmierczuk A., Kiliańska Z. M., "Rola białek szoku cieplnego w apoptozie komórek Role of heat shock proteins in cell apoptosis." *Journal cover* 67 (2013).
19. Śliwińska – Hill U., Trocha J., Najnowsze terapie przeciwnowotworowe, *Postępy Farmacji* (online)

Pracę recenzował: dr hab. Roman Paduch, Zakład Wirusologii i Immunologii, Wydział Biologii i Biotechnologii, UMCS

Nowotworowe komórki macierzyste

Streszczenie

Wiele lat badań i prób opracowania skutecznej terapii nowotworów nie przyniosło do tej pory pożądanych efektów – nowotwory są nadal jedną z częstszych przyczyn zgonów. Kluczowe dla zaprojektowania skutecznego leczenia jest dokładne poznanie mechanizmu samego procesu nowotworzenia. Odkrycie nowotworowych komórek macierzystych (ang. cancer stem cells, CSC) umożliwiło zrewidowanie poglądów naukowców na zagadnienie kancerogenezy. Prawdopodobnie to właśnie CSC odpowiedzialne są za oporność nowotworów na konwencjonalne metody leczenia, a także za odtwarzanie choroby i przerzutowanie. Zrozumienie molekularnych mechanizmów ich działania pozwoli na stworzenie skutecznych metod eliminowania ich z organizmu, a co za tym idzie – skuteczne leczenie chorych.

Słowa Kluczowe: komórki macierzyste, nowotwory, onkogeneza, terapia przeciwnowotworowa

Cancer stem cells

Abstract

Many years of research and testing to develop effective cancer therapy has not produced the desired results so far – cancer is still one of the most frequent causes of death. Key to the design of effective treatment is clear understanding of the mechanism of the process of carcinogenesis. The discovery of cancer stem cells (called cancer stem cells, CSC) has enabled scientists to revise views on the issue of carcinogenesis. Probably this is CSC are responsible for resistance to conventional cancer therapies, as well as playback of the disease and metastasis. Understanding the molecular mechanisms of their actions will help to create effective methods to eliminate them from the body, and as a result – an effective treatment for patients.

Key words: stem cells, cancer, cancerogenesis, cancer therapy

Autorzy:

Olga Rodzik, rodzik.olga@gmail.com, Wydział Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej

Olga Zaleska, oz113@wp.pl, Wydział Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej

Od techniki prążkowania do zaawansowanych metod molekularnych – czyli o historii cytogenetyki

Wstęp

Cytogenetyka jest działem genetyki, który zajmuje się badaniem struktury i budowy chromosomów w komórce. Wykorzystuje mało skomplikowane techniki, pozwalające na uzyskanie wielu istotnych informacji. Dzięki osiągnięciom nauki z ostatnich kilkunastu lat, obecnie obserwujemy prężny rozwój metod badawczych, które znalazły zastosowanie zarówno w badaniach naukowych jak i w diagnostyce klinicznej.

Współcześnie dział ten możemy podzielić na dwie odrębne gałęzie, jakimi są cytogenetyka klasyczna i cytogenetyka molekularna. Przedmiotem zainteresowania pierwszej z wymienionych jest zachowanie chromosomów podczas podziałów komórkowych oraz ich udział w rekombinacji genów. Posługuje się technikami prążkowania chromosomów i analizą kariotypu. Głównym nurtem cytogenetyki molekularnej jest badanie struktury i funkcji chromosomów w jądrze interfazowym. Dokonuje się tego za pomocą metody FISH i jej modyfikacji. Jednym z najważniejszych etapów każdego badania cytogenetycznego jest sporządzenie preparatów cytogenetycznych o wysokiej jakości, który zapewnia uzyskanie wiarygodnego wyniku analizy kariotypu [1–3].

1. Przygotowanie materiału do badań cytogenetycznych

Analiza kariotypu polega na badaniu liczby i struktury chromosomów pacjenta, które uzyskuje się z dzielących się mitotycznie komórek somatycznych. Badanie cytogenetyczne przebiega w kilku etapach są to:

- Pobranie materiału do badań,
- Hodowla komórkowa,
- Traktowanie i utrwalenie hodowli komórkowej,
- Sporządzenie preparatów i ich „dojrzwanie”,
- Wybarwienie chromosomów,

¹Email: n.bilska@onet.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej

²Email: fankado@buziaczek.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej

³Email: pgil.poczt@vp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej

- Analiza mikroskopowa,
- Diagnoza.

Najczęściej wykorzystywanym materiałem do badań cytogenetycznych są: limfocyty krwi obwodowej, fibroblasty skóry, płyn owodniowy, komórki trofoblastu, szpik kostny. W uzasadnionych przypadkach można posłużyć się krwią pępowinową przy ocenie kariotypu płodu. Przełomowym momentem w cytogenetyce było zastosowanie kolchicyny do zatrzymania mitozy w czasie metafazy w 1937 r. oraz płynów hipotonicznych pozwalających na rozproszenie chromosomów płytki metafazowej w 1952 r. Substancje te są stosowane do dnia dzisiejszego, choć coraz częściej zamiast kolchicyny wprowadza się jej analog – Colcemid. Celem hodowli komórek do tego typu badań jest uzyskanie jak największej liczby metafaz, jak najmniej cytoplazmy oraz jak najdłuższych chromosomów [4–7].

Po zakończeniu hodowli należy sporządzić odpowiedniej jakości preparat z odpowiednim rozproszeniem chromosomów w metafazie, który jest podstawą badania cytogenetycznego. Po dziś dzień wiele laboratoriów genetycznych wykonuje to sposobem manualnym, mimo iż jest to proces bardzo trudny i wymaga dużego doświadczenia [4–5]. Bardzo pomocne i usprawniające pracę jest korzystanie z najnowszych rewolucyjnych urządzeń do automatycznego wykonywania preparatów cytogenetycznych. Przykładem może być aparat ZenDropper belgijskiej firmy ZenTech, który jest bardzo nowoczesnym sprzętem pozwalającym na bezpieczną i precyzyjną preparatykę próbek do kariotypowania. Jego zasada działania polega na automatycznej jednorodnej dystrybucji komórek badanego pacjenta na standardowych szkiełkach, w wyniku której otrzymujemy wysokiej jakości preparat cytogenetyczny. Zastępuje on skomplikowane i pracochłonne czynności manualne techników, a także chroni pracowników przed szkodliwymi oparami metanolu i kwasu octowego. Wykorzystuje on technologię „Layer Water”, która zapewnia jednorodny rozkład komórek, wysoką powtarzalność i wydajność jak również oszczędność czasu, gdyż w ciągu 25 minut można wykonać 40 preparatów.

2. Techniki prążkowania chromosomów

Pierwszych prób obserwacji chromosomów w materiale zwierzęcym podjął się Walther Flemming w latach 1879–1889. Przełomowym wydarzeniem w nauce jaką jest genetyką było odkrycie przez Watson’a i Crick’a w roku 1953 struktury DNA, którzy za swoje osiągnięcie zostali uhonorowani nagrodą Nobla w 1962 r. Od tego momentu dostrzec można szybkie tempo rozwoju tej dyscypliny badawczej. Z punktu widzenia cytogenetyki istotnym jest fakt ustalenie prawidłowej liczby chromosomów w komórce przez Joe Hin Trio w 1956 roku. W latach 1970–1975 opisano pierwsze techniki prążkowania, które są stosowane do dnia dzisiejszego w diagnostyce klinicznej jako podstawa do dokładnej identyfikacji każdej z 23 par chromosomów. Z pomocą analizy

prążkowej uzyskujemy odzwierciedlenie ich strukturalnego i funkcjonalnego zróżnicowania [4,6,8].

Najczęściej stosowanym wybarwieniem chromosomów jest prążkowanie G [GTG]. Metoda ta polega na uprzednim trawieniu badanego materiału z wykorzystaniem trypsyny, a następnie barwieniu odczynnikami Giemzy. Jako wynik otrzymuje się wzór prążkowy specyficzny dla każdego z chromosomów, w skład którego wchodzi 300 – 400 naprzemiennie ułożonych jasnych i ciemnych prążków, różniących się intensywnością zabarwienia i wielkością. Jasne obszary odpowiadają euchromatynie, która wykazuje aktywność transkrypcyjną, podlegającej wczesnej replikacji. Różnią się one zestawem białek od ciemnych obszarów G, które są charakterystyczne dla regionów późno replikujących się materiału genetycznego, bogatych w pary zasad adenina – tymina, zawierających pojedyncze aktywne geny. Technika ta znalazła zastosowanie w rutynowej analizie kariotypu do wykrywania i rozpoznawania aberracji chromosomowych [1,2,5,7,8].

Podobnym barwieniem do wyżej opisanego jest prążkowanie Q [QFQ], lecz obraz prążków otrzymujemy w wyniku traktowania materiału badanego fluorochromem jakim jest kwinakryna. Poza nielicznymi wyjątkami jakim są: dystalny fragment chromosomu Y, regiony centromerowe i prążków G, w których występuje jasna fluorescencja, wzór prążków Q odpowiada wzorowi prążków G. Metoda ta dodatkowo umożliwia identyfikację wariantów morfologicznych chromosomu Y, a także satelitów i regionów centromerowych chromosomów akrocentrycznych [1,2,5].

Kolejnym użytecznym barwieniem jest prążkowanie C [CBG] uwidaczniające prążki chromosomowe odpowiadające heterochromatynie konstitutywnej, poprzez zastosowanie nasyconego roztworu wodorotlenku baru i odczynnika Giemzy. Umożliwia ono ustalenie regionów centromerowych chromosomów [1,2,5].

Z wykorzystaniem różnych metod uzyskuje się także prążki R. Jedną z nich jest barwienie fluorescencyjne z użyciem oranżu akrydyny lub chromomycyny, a także barwienie odczynnikami Giemsy. Uzyskany wzór jest odwrotnością wzoru prążków G. Technika ta jest szczególnie przydatna do rozpoznawania aberracji zlokalizowanych w końcowych częściach chromosomów [1,2,5].

Barwienie azotanem srebra (barwienie NOR) umożliwia wykrycie obecności w krótkich ramionach chromosomów akrocentrycznych aktywnych regionów organizatorów jąderkotwórczych. Oprócz tego można zidentyfikować aberracje z udziałem krótkich ramion chromosomów 13–15 i 21–22 [1,2,5].

Analizy chromosomów dokonuje się przy użyciu mikroskopu i systemu komputerowego. Układanie kariotypu należy rozpocząć od grupy G chromosomów, następnie powinno się przejść do grupy F, E, D, a potem do grup B i A. Grupa C badana jest na samym końcu, ponieważ jest ona najtrudniejsza do zidentyfikowania [1,5,4].

3. FISH – fluorescencyjna hybrydyzacja in situ

Obecnie wykorzystywane są bardziej zaawansowane metody molekularne, wśród których można wyróżnić fluorescencyjną hybrydyzację in situ. Pionierami techniki FISH byli Gall i Pardue, którzy opisali hybrydyzację in situ z sondami znakowanymi radioaktywnie w 1969 roku, które z biegiem lat zostały wparte przez sondy znakowane bezpośrednio fluorochromami lub pośrednio cząstkami reporterowymi, np. biotyną lub digoksygeniną. Natomiast największe znaczenie kliniczne ma zastosowanie sond locus-specyficznych, centromerowych a także malujących. Metoda ta wykorzystuje sondę molekularną stanowiącą krótki oligonukleotydowy odcinek DNA o znanej sekwencji i położeniu w prawidłowych chromosomach, który w odpowiednich warunkach hybryduje do komplementarnej sekwencji w badanym materiale genetycznym. Przedmiotem badań mogą być skrawki tkanek w preparacie cytologicznym, chromosomy metafazowe oraz jądra interfazowe (wynik uzyskuje się w ciągu 24–48 h). Wynik analizy obserwuje się za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. Lokalizacja miejsc hybrydyzacji sond znakowanych bezpośrednio jest możliwa natychmiast po zakończeniu reakcji, dzięki zastosowaniu zmodyfikowanych nukleotydów zawierających fluorochromy (np. FITC, Aqua, jodek propidyny, rodamina, DAPI). Detekcja sond znakowanych pośrednio jest możliwa dzięki zastosowaniu przeciwciał skoniugowanych z fluorochromem, specyficznie wiążących się z sondą. Niewątpliwą zaletą techniki FISH jest możliwość analizowania genomu bez względu na fazę cyklu komórkowego, co niejednokrotnie umożliwia rezygnację z hodowli komórek nowotworowych. Dokładność i czułość tej metody pozwala na ujawnienie licznych i złożonych aberracji chromosomów zarówno liczbowych jak i strukturalnych. Jednak niezbędne jest wcześniejsze sformułowanie hipotezy klinicznej o wystąpieniu aberracji badanego regionu [1–3, 5, 7–10].

Zastosowanie fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ:

- W diagnostyce prenatalnej do wykrywania najczęściej występujących aneuploidii z użyciem sond specyficznych dla chromosomów: 21,13,18, X, Y,
- W onkologii i hematologii do identyfikacji fuzji genowych, delecji i amplifikacji onkogenów,
- W diagnostyce preimplantacyjnej,
- Analiza ekspresji genów,
- Mapowanie i sekwencjonowanie genów,
- Wykrycie chromosomów markerowych,
- Identyfikacja dodatkowego materiału genetycznego w nieprawidłowych chromosomach,
- Wykrycie aberracji submikroskopowych, czyli nie widocznych w obrazach uzyskanych technikami prążkowymi w rutynowej ocenie kariotypu,
- Wyznaczenie minimalnej wielkości regionu krytycznego, który będzie warunkował określony zespół kliniczny.

4. Modyfikacje metody FISH

- M-FISH

Dalszy rozwój spowodował opracowanie techniki wielobarwnego kariotypowania FISH (M – FISH, multiplet FISH). Wykorzystuje ona hybrydyzację do chromosomów metafazowych specyficznych dla każdego z chromosomów sond, z których każda jest wyznakowana innym zestawem fluorochromów wiążących się zDNA. Do znakowania sond najczęściej stosuje się mieszaninę 5 różnych barwników fluorescencyjnych w odmiennych stosunkach ilościowych, efektem tego otrzymuje się obraz wszystkich chromosomów, a każdy z nich posiada inną barwę. Oceny otrzymanego wyniku dokonuje się za pomocą specjalnego oprogramowania komputerowego [1,5].

- SKY (metoda analizy widmowej kariotypu)

Kolejną modyfikacją klasycznej metody FISH jest analiza widmowa kariotypu. Technika ta jest połączeniem mikroskopii optycznej, spektrofotometrii oraz obrazowania kamerą. Wykorzystuje ona sondy malujące, które są wyznakowane za pomocą metody kombinacyjnej. 24 sondy ulegają reakcji hybrydyzacji do chromosomów metafazowych, co można zaobserwować w wyniku emisji światła poszczególnych barwników fluorescencyjnych różniących się widmem emitowanego promieniowania w zakresie światła widzialnego oraz bliskiej podczerwieni. W wyniku obróbki w odpowiednim programie komputerowym, który nadaje chromosomom sztuczne kolory, otrzymuje się wielobarwny obraz kariotypu, w którym każda para chromosomów posiada inną barwę. Technika ta pozwala na szybkie zdiagnozowanie skomplikowanych rearanżacji chromosomowych i jest wykorzystywana przede wszystkim w cytogenetyce chorób nowotworowych, które zwykle charakteryzują się wieloma, złożonymi aberracjami chromosomowymi [1,5,11].

Jednym z ostatnich osiągnięć techniki jest w pełni zautomatyzowany mikroskop OLYMPUS BX61. Jest on wyposażony w system wysokiej jakości obrazu i umożliwia pracę w trzech trybach: z wykorzystaniem szerokokątnego światła przechodzącego, szerokokątnej fluorescencji oraz uporządkowanej iluminacji. Sprzęt ten korzysta z dwóch oddzielnych systemów kamer – kolorowego i monochromatycznego. Tryb uporządkowanej iluminacji pozwala użytkownikom na gromadzenie konfokalnych zdjęć, które mogą być następnie wyświetlane jako zdjęcia 3D lub filmy. Jako znaczniki wykorzystywane są powszechnie używane barwniki fluorescencyjne tj. DAPI, FITC TRITC oraz CY5. Źródłem oświetlenia jest lampa metalohalogenkowa o szerokim spektrum osiowania. Urządzenie to zapewnia wysoki kontrast obserwacji wewnętrznych struktur żywych komórek. Zróżnicowane oświetlenie i zaawansowana optyka gwarantują najwyższej jakości zdjęcia cyfrowe. System optyczny UIS2 zapewnia wysoką rozdzielczość, doskonałą reprodukcję kolorów oraz korekcje

aberracji optycznych. Mikroskop ten najczęściej jest stosowany do analizy cytogenetycznej chromosomów badanych metodą FISH, M-FISH i SKY-FISH.

- CGH – porównawcza hybrydyzacja genomowa

Jest przełomowym badaniem w diagnostyce chorób genetycznych. Porównawcza hybrydyzacja genomowa [CGH] jest zmodyfikowaną techniką FISH i jest przełomowym badaniem w diagnostyce chorób genetycznych. Umożliwia ona detekcję zmian liczby kopii sekwencji DNA w genomie. Polega na równoczesnym i kompetytywnym hybrydyzowaniu dwóch znakowanych różnymi fluorochromami próbek DNA pochodzącymi z komórek nowotworowych pacjenta i materiału referencyjnego do prawidłowej płytki metafazowej. DNA pacjenta znakuje się, np. FITC (fluorescencja zielona), zaś DNA wzorcowe, np. TR (fluorescencja czerwona) w reakcji nick–translacji, następnie miesza się w stosunku 1:1, nanosi na płytkę metafazową i po reakcji hybrydyzacji poddaje się analizie mikroskopii fluorescencyjnej z zastosowaniem odpowiednich filtrów i kamery CCD podłączonej do komputera. Po zakończeniu kariotypowania, mierzy się stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej na całej długości wzdłuż chromosomów. Badaniu poddaje się 10–16 chromosomów dla każdego przypadku. Zakres prawidłowy stosunku mieści się w granicach 0.75–1.25. Jeżeli obserwuje się przewagę fluorescencji zielonej to świadczy to o duplikacji danego regionu w chromosomie, zaś przewaga fluorescencji czerwonej przemawia za delecją analizowanego regionu. Głównymi zaletami opisaney metody jest możliwość badania całego genomu, wykorzystanie materiału archiwalnego, pominięcie etapu hodowli i izolacji chromosomów z komórek nowotworowych. Technika ta nie jest pozbawiona wad, gdyż nie pozwala na wykrycie aberracji zrównoważonych, ma ograniczone zastosowanie w identyfikacji mozaikowości oraz aberracji telomerowych, a akże nie może być wykorzystana do badań aberracji w obrębie centromerów. CGH zyskała ogromna przewagę nad FISH dzięki możliwości identyfikacji zmian w genomie wcześniejszego sformułowania hipotezy o ich istnieniu. Czas trwania badania na ogół nie przekracza kilku dni [1–3, 5,10].

- Array–CGH

W wyniku rozwoju nauki obserwujemy wprowadzanie nowych modyfikacji metody CGH. Jedną z nich jest możliwość wykorzystania mikromacierzy w badaniach cytogenetycznych. Array– CGH jest modyfikacją CGH, do której powstania przyczyniło się niezmiernie istotne wydarzenie z punktu widzenia genetyki klinicznej jakim było zsekwencjonowanie ludzkiego genomu. Skonstruowaniu odpowiednich sond oligonukleotydowych umożliwiających wykrycie nie stwierdzonych dotychczas zaburzeń mogących być odpowiedzialnymi za liczne stany patologiczne, towarzyszyło odkrycie wariantów patogennych CMV. Dzięki dużej rozdzielczości tej metody możliwe jest wykrycie aberracji submikroskopowych rzędu kilkuset a nawet kilku–kilkunastu par zasad. Rozdzielczość jest ograniczona tylko i wyłącznie liczbą oraz wielkością sond, które zostały użyte do projektowania mikromacierzy. Zasada metody polega na tym, że

sondy zostają utrwalone na specyficznych szkiełkach tzw. mikromacierzach, a następnie hybryduje się do nich znakowane dwoma różnymi barwnikami fluorescencyjnymi genomowe DNA pacjenta oraz DNA referencyjne. Array CGH pozwala na jednoczesne wykrycie aneuploidii, amplifikacji, duplikacji, delecji regionu, który wykrywa dana sonda. Technika ta szczególnie chętnie wykorzystywana jest w diagnostyce specyficznych, izolowanych wad wrodzonych. Umożliwia ona także poszerzenie dotychczasowej wiedzy na temat nowych zespołów mikrodelecyjnych/ mikroduplikacyjnych i znaczenia określonych genów dla prawidłowego rozwoju człowieka. W Polsce od 2002 roku się w systemie mikromacierzy Genechip Affymetrix, który jest coraz chętniej i powszechniej stosowany w jednostkach naukowo-badawczych w całym kraju. System ten składa się ze skanera, stacji fluidycznej i pieca hybrydacyjnego. GeneChips Affymetrix są produkowane w technologii syntezy oligonukleotydów in situ z wykorzystaniem fotolitografii. Takie mikromacierze charakteryzują się gęstszym upakowaniem sond w porównaniu do mikromacierzy drukowanych. Znakowanie jest jednokolorowe. Na chwilę obecną dostępne są chipy zawierające ok. 6 mln krótkich sond na powierzchni zaledwie 1 cm². Umożliwiają one na wykrycie nowych genów, pojedynczych niesparowań, SNF i mutacji, dlatego też znalazły zastosowanie m.in. w badaniach tkanek nowotworowych. System Affymetrix pozwala również na ustalenie roli genów w rozwoju chorób, skuteczności i bezpieczeństwa leczenia pacjentów, a także wpływu na ludzkie życie wielu różnorodnych czynników biologicznych. Ich główną wadą jest wysoki koszt badania [12–14].

5. Podsumowanie

W ostatnich kilkudziesięciu latach obserwuje się prężny rozwój cytogenetyki. Dzięki osiągnięciom bio-informatyki analiza chromosomów stała się w pełni zautomatyzowana co umożliwia uzyskanie szybkich i wiarygodnych analiz, które mogą być przechowywane w archiwum komputerów. Niestety koszt sprzętów oraz konieczność zatrudnienia wysoko wykwalifikowanego personelu sprawia, że najnowocześniejsza aparatura znalazła zastosowanie głównie w jednostkach naukowo-badawczych. W badaniach klinicznych nadal powszechnie wykorzystywane są techniki prążkowania i fluorescencyjna hybrydacja In situ oraz jej modyfikacje.

Uwagi ogólne

Praca powstała z wykorzystaniem sprzętu zakupionego w ramach Projektu: „Wyposażenie innowacyjnych laboratoriów prowadzących badania nad nowymi lekami stosowanymi w terapii chorób cywilizacyjnych i nowotworowych” w ramach Programu Operacyjnego Rozwój Polski Wschodniej 2007–2013, Osi priorytetowej I Nowoczesna Gospodarka, Działania I.3 Wspieranie Innowacji.

Literatura

1. Bal J. Biologia molekularna w medycynie – Elementy genetyki klinicznej, red., Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2001, s. 95–113.
2. Bradley J., Johnson D., Pober B., Genetyka medyczna, wydanie I, Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2009: 73–75.
3. Małuszyńska J. Zobaczyć gen, chromosom i genom – czyli badania cytogenetyki molekularnej, „Nauka”, 2007; 4: 107–115.
4. Boczkowski K., Zarys genetyki medycznej, wydanie II, Warszawa, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, 1990, s. 61–62.
5. Srebnia M.I., Tomaszewska A., Badania cytogenetyczne w praktyce klinicznej, Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008.
6. Bal J. Biologia molekularna w medycynie – Elementy genetyki klinicznej, Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2001: 399–403.
7. Woroniecka R., Pieńkowska–Grela B., Wykrywanie obecności markera Philadelphia(Ph) technikami cytogenetycznymi, „Acta Haematologica Polonica”, Lublin, 2004, tom 35, 2, s. 189–201.
8. Pieńkowska–Grela B. Zastosowania cytogenetyki w diagnostyce chłoniaków, [W:] Nowotwory układu chłonnego, red. Walewski J., Warszawa, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, 2011, s. 31–38.
9. Pieńkowska–Grela B. Cytogenetyka w diagnostyce nowotworów [W:] Podstawy onkologii klinicznej, red. Meder J., Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, 2011, s. 47–56.
10. Szczaluba K., Obersztyn E., Mazurczak T. Zastosowanie nowoczesnych technik cytogenetyki molekularnej w diagnostyce wrodzonych wad rozwojowych, „Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia”, 2010, tom 3, zeszyt 2, s. 108–116.
11. Constantinou M., Kałużewski B., Wykorzystanie techniki FISH w diagnostyce aberracji chromosomowych trudnych do zidentyfikowania za pomocą klasycznych technik cytogenetycznych, Diagnostyka Laboratoryjna, Kraków, 2001 T. 37, supl. 1 s. 77–85.
12. Żmieńko A., Handschuh L., Góralski M., Figlerowicz M. Zastosowanie mikromacierzy DNA w genomice strukturalnej i funkcjonalnej, „BioTechnologia”, Polska Akademia Nauk, Poznań, 2008, nr 4, s. 39–53.
13. Szczepanek J., Styczyński J., Haus O., Tretyn A., Wysocki M., Postępy w kierunku molekularnej klasyfikacji nowotworów u dzieci, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej”, Wrocław, 2008, nr 62, s. 222–240.
14. Jarzab B., Gubała E., Lange D., Mikromacierze DNA i profil ekspresji genów raka brodawkowatego tarczycy, „Endokrynologia Polska”, Zabrze, 2005, tom 56, nr 3, s. 294–301.

Recenzent pracy: dr hab. n. med. Janusz Kocki, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Od techniki prążkowania do zaawansowanych metod molekularnych – czyli o historii cytogenetyki

Streszczenie

Dzięki osiągnięciom nauki z ostatnich kilkunastu lat, obecnie obserwujemy prężny rozwój metod badawczych, które znalazły zastosowanie zarówno w badaniach naukowych jak i w diagnostyce klinicznej. Pod koniec XX wieku dokonano wielu, zakończonych sukcesem prób badania kariotypu i udoskonalania technik pozwalających na wykrycie nieprawidłowości strukturalnych i ilościowych w chromosomach. Zaowocowało to pojawieniem się techniki FISH i jej modyfikacji, które powoli wypierają powszechnie stosowane techniki prążkowania. Zaletami nowoczesnych metod badawczych cytogenetyki jest brak konieczności zakładania hodowli komórkowych i izolacji chromosomów, co znacznie przyspiesza czas analizy. W dalszym ciągu obserwuje się udoskonalanie tych technik oraz poszukiwanie nowych rozwiązań technologicznych i diagnostycznych, mających na celu usprawnienie pracy a także wykrywanie nieznanego wpływu genów na powstawanie chorób.

Słowa kluczowe : cytogenetyka, metody prążkowania, FISH, CGH

From the banding technique to advanced molecular methods, or about the history of cytogenetics

Abstract

Thanks to scientific achievements in the recent several years, one can now observe the swift development of research methods, which found a use for both scientific research, as well as in clinical diagnostics. Towards the end of the 20th century, numerous successful attempts were undertaken to study karyotypes and to improve the techniques allowing the detection of structural and quantitative abnormalities in chromosomes. This resulted in the emergence of the FISH technique (fluorescent in situ hybridization) and its modifications which are slowly superseding the widely used banding technique. One of the advantages of modern research methods used in cytogenetics is the lack of need for establishing cell cultures or for isolating chromosomes, which significantly speeds up the analysis. One can still observe the improvement of these techniques and the search for new technological and diagnostic solutions, which is aimed at making the process more efficient, and also at detecting the unknown influence of genes on the formation of diseases)

Key words: cytogenetics, banding techniques, FISH, CGH (Comparative Genomic Hybridization)

Autorzy pracy:

Natalia Bilska, n.bilska@onet.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej

Justyna Piróg, fankado@buziaczek.pl Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej,

mgr Paulina Gil-Kulik, pgil.poczt@vp.pl, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Zakład Genetyki Klinicznej, Studenckie Koło Naukowe Laboratoryjnej Genetyki Medycznej

Perspektywy wykorzystania proteaz cysteinowych i ich inhibitorów w biotechnologii i medycynie

Wstęp

Peptydazy – znane również jako proteazy, proteinazy i hydrolazy peptydowe, są najlepiej poznanymi enzymami, rozszczepiającymi wiązania peptydowe w polimerach białkowych. Peptydazy można podzielić na dwa główne podtypy:

Typ pierwszy używa aktywnego tlenu pochodzącego z cząsteczki wody jako nukleofila. W miejscu aktywnym może być obecny kation metalu np. u metalopeptydaz. Enzymy tej grupy nie tworzą przejściowych wiązań kowalencyjnych.

Typ drugi peptydaz tworzy natomiast przejściowe wiązania kowalencyjne pomiędzy substratem a tlenem katalitycznym seryny (peptydazy serynowe), treoniny (peptydazy treoninowe), lub siarką cysteiny (proteazy cysteinowe) [1].

Występowanie proteaz we wszystkich żywych organizmach wskazuje na ich kluczową rolę w wielu metabolicznych i regulacyjnych procesach biologicznych. Proteazy są enzymami niezbędnymi do uruchamiania substancji odżywczych wymaganych do wzrostu i proliferacji komórek. Są zaangażowane w procesy, takie jak ekspresja genów, replikacja DNA, transport białek, wzrost i różnicowanie komórek, cykl komórkowy, reakcje szoku cieplnego, odpowiedź na uszkodzenie DNA, stres oksydacyjny czy programowaną śmierć komórek. Za regulację aktywności proteaz odpowiadają ich inhibitory. Kryterium podziału inhibitorów może być oparte na tym, jaką klasę enzymów hamują (np. inhibitory proteaz serynowych czy cysteinowych) [2].

Peptydazy cysteinowe są znane również jako tiolowe, sulfhydrylowe lub cysteinylowe. W bazie danych MEROPS, peptydazy cysteinowe są podzielone na dziewięć klas, zwanych klanami, w tym jeden klan niezaklasyfikowanych (ang. unclassified):

- klan CA (np. katepsyny lizosomalne),
- klan CD (np. kaspazy),
- klan CE (np. peptydazy Ulp1),

¹ justynadulemba@gmail.com, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Biologii i Biofizyki, Zakład Biochemii

² anna.matuszewska@poczta.umcs.lublin.pl, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Biologii i Biofizyki, Zakład Biochemii

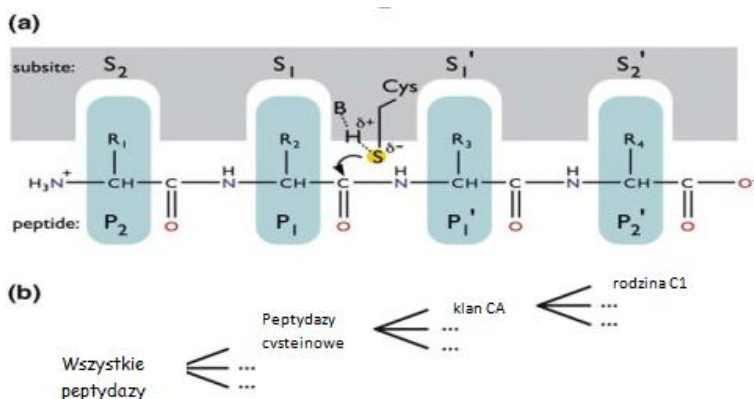
³ dawid.stefaniuk@umcs.pl, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Biologii i Biofizyki, Zakład Biochemii

⁴ magdalena.jaszek@poczta.umcs.lublin.pl, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Biologii i Biofizyki, Zakład Biochemii

- klan CF (np. peptydaza pyroglutamyłowa),
- klan CL (np. sortaza A),
- klan CM (np. peptydaza wirusa zapalenia wątroby typu C),
- klan CN (np. sindbis virus–type nsP2 peptidase),
- klan CO (np. dipeptydylopeptydaza IV) [1].

1. Charakterystyka wybranych proteaz cysteinowych

Proteazy cysteinowe to enzymy hydrolizujące wiązania peptydowe z udziałem czynnej reszty cysteinowej w centrum katalitycznym. Rozszczepiają one polipeptydy w miejscu, gdzie w tworzeniu wiązania peptydowego uczestniczą takie aminokwasy jak arginina, glicyna lub lizyna. Enzymy te biorą udział w metabolizmie wielu białek zarówno endo– jak i egzogennych [3].



Rys.1. Mechanizm działania peptydaz. (a) Wiązanie substratów peptydowych do podjednostki peptydazy ustawia siarkę w pobliżu grupy karbonyłowej trawionego wiązania peptydowego. Siarka obecna w miejscu aktywnym cysteiny jest nukleofilowa z powodu obecności grupy zasadowej np. histydyny. Aminokwasowe reszty białkowe i podjednostki są liczone i oznaczane w odniesieniu do trawionego wiązania peptydowego. Skróty: S, podjednostka; P, aminokwasowa reszta białkowa; R, łańcuch boczny. (b) W bazie danych MEROPS wszystkie peptydazy przydzielone są do rodzin, które są pogrupowane w większe klany z których każdy posiada wspólnego przodka. Członkowie różnych klanów nie są homologiczni (tzn. nie są one uważane za ewolucyjnie pokrewne) [1]

Proteazy cysteinowe swoją nazwę zawdzięczają funkcjom katalitycznym cysteiny, która pośredniczy w hydrolizie białek poprzez atak nukleofilowy na węgiel karbonyłowy wiązania peptydowego. Proteazy cysteinowe podzielono na klany, które prawdopodobnie powstały niezależnie, jednakże cechą, która je łączy jest wykorzystanie cysteiny do katalizy hydrolizy wiązań peptydowych. W oparciu o podobieństwa klany zostały podzielone na rodziny. Najlepiej dotychczas poznany został klan CA, proteazy do niego należące wykorzystują reszty katalityczne cysteiny, histydyny i asparaginy, których kolejność jest niezmienna w podstawowej sekwencji proteazy [4].

Klan CA, Rodzina C1 (rodzina papainy) proteaz cysteinowych jest dobrze scharakteryzowany również dla drobnych (jednokomórkowych) organizmów eukariotycznych jakimi są pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium*. Analiza sekwencji genomu *P. falciparum* (zarodziec sierpowy) sugeruje, że klan CA proteaz cysteinowych zawiera aż cztery falcypainy, trzy peptydazy dipeptydylowe, dziewięć białek związanych z antygenami serynowymi, i homologi kalpainy [4].

1.1. Występowanie i struktura proteaz cysteinowych

Proteazy cysteinowe są obecne we wszystkich organizmach żywych, takich jak wirusy, bakterie, pierwotniaki, rośliny i zwierzęta. Fakt ten czyni je niezwykle ciekawym obiektem badań [5].

1.1.1. Wirusowe proteazy cysteinowe

Niektóre wirusy, takie jak pikornawirusy (łac. Picornaviridae), obejmujące rinowirusy, wirusy polio oraz wirusy zapalenia wątroby typu A (HAV), kodują swoje białka w postaci pojedynczego prekursora, rozczepiającego się w określonych miejscach dzięki peptydazom, pochodzącym z białka prekursorowego. Enzymami tymi są proteazy cysteinowe [6].

1.1.2. Bakteryjne proteazy cysteinowe

Klostryaina wyizolowana z *Clostridium histolyticum* (laseczka tkankobójcza) należy do rodziny C11. Jest uważana za proteazę prototypową, działającą zgodnie z ogólnym mechanizmem proteaz cysteinowych, jednakże różni się od rodziny papainy swoją specyficznością i sekwencją [6].

1.1.3. Grzybowe proteazy cysteinowe

- W roku 1993 wyizolowano drożdżowy enzym, będący odpowiednikiem ssaczjej hydrolazy bleomycyny. Enzym ten jest aminopeptydazą cysteinową, a sekwencja jego miejsca aktywnego odpowiada sekwencji peptydaz należących do rodziny papainy [6],
- Metakaspazy. Enzymy te zostały zaklasyfikowane do klanu CD, rodziny C14, podrodziny C14B [7][8]. Metakaspazy to podgrupa w rodzinie C14. Są odpowiednikami kaspaz pośredniczących w procesach apoptozy u organizmów zwierzęcych. Metakaspazy występują w organizmach grzybów, roślin, pierwotniaków pasożytniczych i bakterii [1]. Podobieństwo do kaspaz obejmuje zarówno strukturę pierwszorzędową z charakterystyczną parą aminokwasów Cys-His jak i strukturę drugorzędową [9],

1.1.4. Proteazy cysteinowe pierwotniaków

Pierwotniaki pasożytnicze to bardzo zróżnicowana grupa organizmów, jednakże większość proteaz z nich izolowanych należy do cysteinowych.

Niektóre z tych enzymów odgrywają kluczową rolę w procesach, takich jak odżywanie oraz inwazja do komórek gospodarza.

- Kruzipaina należąca do klanu CA, rodziny C1, została wyizolowana z *Trypanosoma cruzi* (świdrowiec amerykański), przenoszącego się na człowieka poprzez organizmy pasożytnicze, powodując trypanosomozę amerykańską. Jest to choroba tropikalna, człowieka i zwierząt spotykana w obu Amerykach. We wczesnym stadium objawy są nieznaczne, następnie przez lata rozwija się przewlekła postać choroby prowadząca do zaburzeń pracy serca, uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, patologicznego poszerzenia jelita. Prawdopodobnie kruzipaina jest enzymem zaangażowanym w ochronę pasożyta przed układem odpornościowym gospodarza poprzez degradację jego IgG,
- Proteazy cysteinowe wyizolowane z *Plasmodium* (zarodziec) mają wysoki stopień podobieństwa do enzymów z rodziny papainy, jednakże występują tam też sekwencje konserwatywne charakterystyczne tylko dla enzymów *Plasmodium* [6]. Najlepiej scharakteryzowanymi enzymami wyizolowanymi z tego pierwotniaka są falcypainy, zaliczane do klanu CA, rodziny C1. Falcypainy to proteazy cysteinowe podobne do papainy. Ich cechą wyróżniającą jest obecność niezwykle dużych pro-domen [4].

1.1.5. Roślinne proteazy cysteinowe

Najintensywniej przebadaną roślinną proteazą cysteinową jest papaina. Pochodzi z *Carica papaya* (melonowiec właściwy), w bazie danych MEROPS enzym ten został zakwalifikowany do klanu CA, rodziny C1 i podrodziny C1A [8][7].

Jest to bardzo stabilna proteaza tiolowa, dobrze poznana z uwagi na ciekawą budowę molekularną oraz wiele zastosowań przemysłowych. Jej struktura składa się z dwóch różnych domen. Pierwsza domena (reszty 1–110) zawiera głównie struktury alfa–helisy, natomiast domena druga (reszty 111–212) w większym stopniu składa się z antyrównoległej beta–harmonijki i w mniejszym stopniu alfa–helisy. Trzy z pięciu reszt tryptofanowych (Trp) są zlokalizowane w pierwszej domenie, dwie znajdują się w domenie drugiej. Enzym posiada siedem reszt cysteinowych, ale tylko jedna z nich, Cys25, daje możliwość utworzenia wolnej grupy tiolowej w centrum aktywnym enzymu, pozostałe biorą udział w formowaniu mostków dwusiarczkowych: Cys22 – Cys63, Cys56 – 95 i Cys153 – Cys200. Stabilność strukturalna jest częściowo spowodowana obecnością rdzenia hydrofobowego [10].

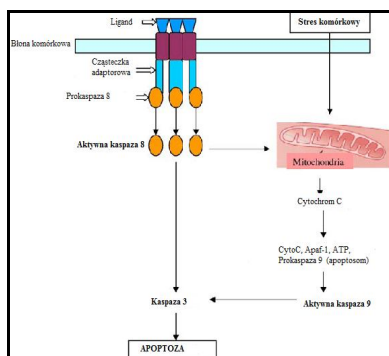
Zasadniczo wszystkie papaino–podobne proteazy cysteinowe są syntetyzowane jako nieaktywne proenzymy, które wymagają aktywacji, obejmującej proteolityczne rozszczepienie N–końcowego fragmentu enzymu, zwanego regionem pro–. Region pro– nie jest jedynie inhibitorem aktywności enzymatycznej, ale także może spełniać inne role. W katepsynach L region pro– jest kluczowym elementem dla prawidłowego pofałdowania nowo syntetyzowanego enzymu oraz zwiększa odporność białka na denaturację w obojętnym lub zasadowym pH [11].

1.1.6. Proteazy cysteinowe ssaków

Najważniejszymi proteazami tiolowymi u ssaków są cytoplazmatyczne kalpainy i katepsyny lizosomalne. Nazwa „katepsyny” została wprowadzona przez Willstätter’a i Bamann’a w 1929 roku, dla enzymu aktywnego w kwaśnym pH [6].

Kaspazy zostały zaklasyfikowane do klanu CD, rodziny C14, oraz podrodziny C14A [7][8]. Wykorzystują resztę cysteiny jako nukleofil. W miejscu aktywnym enzymu obecne są histydyna i cysteina (His–Cys). Kaspazy są syntetyzowane jako nieaktywne proenzymy, aktywowane na drodze proteolizy. Ich działanie powoduje charakterystyczne zmiany w komórce, objawiające się na przykład reorganizacją cytoplazmy i chromatyny jądrowej.

Kaspazy są podstawowym składnikiem procesu apoptozy, niektóre z nich są również niezbędne w układzie immunologicznym do prawidłowego przebiegu procesu dojrzewania cytokin. Zaburzenia w przebiegu procesu apoptozy prowadzą do rozwoju nowotworów i zaburzeń autoimmunologicznych oraz chorób, np.: Alzheimer’a czy Parkinsona [12].



Rys. 2. Etapy sygnalizacji dwóch szlaków apoptozy. W szlaku receptorów śmierci, po interakcji z ligandami receptory werbuja białko adaptorowe, które aktywuje kaspazy inicjatorowe. Aktywne kaspazy inicjatorowe aktywują efektorowe w celu wywołania apoptozy. W szlaku mitochondrialnym docierające sygnały stymulują mitochondria do uwolnienia cytochromu c, który wiąże się do białka Apaf-1, powstaje również prokaspaza 9. Aktywna Kaspaza – 9 aktywuje kaspazy efektorowe, które są wspólne dla obu tych ścieżek [12]

Lizosomalne proteazy cysteinowe

Katepsyny: spośród wszystkich cysteinowych proteaz lizosomalnych, katepsyny B zostały najintensywniej przebadane. Pomimo tego, że izolowano je z różnych organizmów, enzymy te nie różniły się znacząco. Zostały zaklasyfikowane do klanu CA, rodziny C1 oraz podrodziny C1A [7][8].

Katepsyny są rodziną homologicznych enzymów o zadziwiająco szerokim spektrum działania, występującym w większości, jeśli nie we wszystkich typach tkanek i komórek. Działają jako komórkowe enzymy porządkujące, zapewniające na przykład rotację makromolekuł, poprzez masową degradację białek. Katepsyny

posiadają również bardzo specyficzne i określone aktywności proteolityczne. Udział w przetwarzaniu antygeny i proteolitycznej aktywacji pro-białek świadczy o ich kluczowej roli w licznych procesach komórkowych. Natomiast ilość wydzielanych katepsyn w reorganizacji macierzy pozakomórkowej podczas gojenia się ran bądź inwazji komórek nowotworowych odzwierciedla stopień ich wszechstronności [13].

Katepsyny to głównie endopeptydazy z kilkoma wyjątkami, które wykazują również aktywność egzopeptydaz. Przykładem takiego enzymu może być katepsyna B, rozczepiająca łańcuchy polipeptydowe, która może również działać jako karboksypeptydaza. Najczęściej występującymi są katepsyny B, H i L podczas, gdy inne, tj. katepsyny F lub S są uznawane jako komórkowo lub tkankowo specyficzne. Większość to białka monomeryczne, są jednak wyjątki, m.in. katepsyna C, która może tworzyć funkcjonalne oligomery [13].

Degradacja białek może odbywać się na drodze dwóch szlaków:

- szlak lizosomalny – poprzez który większość białek komórkowych jest nieselektywnie degradowana,
- szlak Nielizosomalny – w którym nieprawidłowe białka są degradowane przez kompleks multikatalityczny (proteasom).

Katepsyny odgrywają główną rolę w transporcie lizosomalnym. Endogenne i egzogenne białka, które są pobierane przez komórkę poprzez endocytozę lub autofagocytozę, transportowane są w endocytach lub autofagocytach i podlegają lizosomalnej ścieżce degradacji po fuzji pęcherzyków z lizosomami. Ze względu na wysokie stężenie katepsyn w lizosomach, komórka musi się chronić przed wysokim potencjałem hydrolitycznym, poprzez odpowiedni poziom inhibitorów. Enzymy ulegają denaturacji w cytozolu i są również kontrolowane przez inhibitory. Dodatkowo katepsyny mogą odgrywać rolę w aktywacji lub dezaktywacji enzymów i hormonów [6].

Nielizosomalne proteazy cysteinowe

Kalpains, odkryte w 1964, to cytoplazmatyczne proteazy cysteinowe. Należą do klanu CA, rodziny C2 wg klasyfikacji MEROPS. Nazwa „kalpains”, nadana w 1981 roku wynika z faktu, że wymagają one do swojej aktywności jonów wapnia (łac. calcium), są to cytoplazmatyczne enzymy, od 7% do około 30% jest związane z membranami. Kalpains to heterodimery składające się z podjednostek katalitycznych o masie ok. 80 kDa oraz podjednostek regulacyjnych o masie ok. 30 kDa. Wszystkie kalpains występujące w danym organizmie korzystają z podobnej podjednostki regulacyjnej, różnice w specyficzności i czułości na jony wapnia wynikają z różnic w budowie podjednostki katalitycznej [6].

2. Przykłady inhibitorów proteaz cysteinowych

Liczba poznanych procesów biologicznych, w których uczestniczą inhibitory proteaz ciągle się zwiększa. Wszędzie tam, gdzie zaangażowane są proteazy to regulatory ich aktywności również są obecne. Inhibitory mają nie tylko znaczenie w regulacji aktywności proteaz. Wiele patogenów, w tym wirusy, bakterie i pasożyty, wykorzystuje proteazy cysteinowe w celu uniknięcia mechanizmów obronnych organizmów infekowanych, co wskazuje na ochronną funkcję inhibitorów w organizmach gospodarzy. z kolei patogeny mogą same stosować inhibitory w celu obejścia systemu odpornościowego gospodarza [14].

Poza inhibitorami pochodzenia naturalnego powszechnie wykorzystywane w badaniach są niespecyficzne inhibitory diagnostyczne proteaz np.:

- E-64, wyizolowany z *Aspergillus japonicus*, inhibitor katepsyn,
- jodoocetan etylu, inhibitor proteazy cysteinowej wyizolowanej z *Allium cepa* L. (cebula zwyczajna) [15].

Tabela 1. Przykłady wybranych inhibitorów i ich występowanie w różnych organizmach. Opracowanie własne na podstawie [7][8]

Organizm	Przykład inhibitora	Klasyfikacja
Bakterie	Stafostatyna A (<i>Staphylococcus ureus</i> , gronkowiec złocisty)	Rodzina I58, zawiera inhibitory proteazy cysteinowej, stafopainy A, wpływ na inne peptydazy nie został wykazany
Grzyby	Klitocypina (<i>Lepista nebularis</i> , lejkówka szarawa)	Rodzina I48, zawiera inhibitory proteaz cysteinowych rodziny C1 tj. papaina, katepsyna L i katepsyna B
Pierwotniaki	Falstatyna (<i>Plasmodium falciparum</i> , zarodziec sierpowy)	Rodzina I71 , zawiera inhibitory proteaz cysteinowych rodziny C1 oraz kalpaina-1 z rodziny C2
Rośliny	Bromeina (<i>Ananas comosus</i> , ananas jadalny)	Rodzina I67 inhibitor proteaz cysteinowych głównie bromelainy
Ssaki	Cystatyna A (<i>Homo sapiens</i> , człowiek rozumny)	Rodzina I25, zawiera głównie inhibitory papaino-podobnych proteaz należących do rodziny C1

*Perspektywy wykorzystania proteaz cysteinowych i ich inhibitorów
w biotechnologii i medycynie*

Tabela 2. Inhibitory proteaz pochodzenia grzybowego i bakteryjnego [2]

Inhibitor (klasyfikacja Merops)	Enzymy na które oddziałuje	Mechanizm działania	Charakterystyka
Tyropina (I31)	Proteazy papaino podobne (rodzina C1), eqistatyna hamuje proteazę asparaginową; katepsynę D (rodzina A1)	Ścisłe wiązanie	Obecny u zwierząt oraz w jednym patogenie bakteryjnym (<i>Coxiella burnetii</i>), który prawdopodobnie nabył ten gen poprzez transfer lateralny
Surwiwina (I32)	Kaspazy (rodzina C14)	Ścisłe wiązanie, kilka mechanizmów	Surwiwina odgrywa podwójną rolę, mitotycznego regulatora podziałów komórkowych oraz jako inhibitora aktywacji kaspaz w procesie apoptozy. Grzybowe odpowiedniki zostały zidentyfikowane w kilku genomach <i>Ascomycetes</i> i <i>Basidiomycetes</i>
„Changasin” (I42)	Papaino podobne proteazy cysteinowe ssaków i pierwotniaków (rodzina C1)	Ścisłe wiązanie	Pasożytnicze „changasins” są zaangażowane w regulację endogennych proteaz cysteinowych istotnych dla ich cyklu życiowego. U bakterii „changasins” pełnią rolę endogennych regulatorów, w niektórych gatunkach chorobotwórczych funkcjonują również jako ochrona przed enzymami gospodarza

Klitocypina (I48) i makrocypina (I85)	Papaino podobne (rodzina C1) , leguminy (rodzina C13), trypsyna (rodzina S1)	Ścisłe wiązanie	Prawdopodobnie pełnią rolę regulacyjną lub biorą udział w ochronie przeciwko szkodnikom
Stafostatyny (I57, I58)	Stafopainy (rodzina C47)	Ścisłe wiązanie. Stafostatyna A (I58) oddziałuje jedynie na stafopainę A, stafostatyna B (I57) hamuje stafopainę B	Unikalne dla bakterii
Inhibitor streptopainy (I69)	Streptopaina (rodzina C10)	Homologicznie do pro-peptydu streptopainy, jest wydzielany przez <i>Streptococcus pyogenes</i> wraz z proteazą docelową	Ograniczone do kilku gatunków bakterii. Ekspresja streptopainy i jej inhibitora jest prawdopodobnie koregulowana
Białko AVR2 (I79)	Proteazy papaino-podobne (rodzina C1)	Nieznane	AVR2 jest czynnikiem wirulencji wyizolowanym z fitopatogenicznego grzyba <i>Passalora fulva</i> , powodującego pleśnienie liści pomidora

2.1. Cystatyny

Cystatyny to białkowe inhibitory proteaz cysteinowych. Stanowią rodzinę białek, których funkcją jest odwracalna inhibicja proteaz cysteinowych. Cystatyny zostały podzielone na trzy podrodziny, na podstawie homologii ich sekwencji, obecność i pozycję wewnątrzłańcuchowych mostków dwusiarczkowych oraz wielkość ich cząsteczki [16].

Termin cystatyny odnosi się do nadrodziny inhibitorów proteaz cysteinowych, obejmujących dużą liczbę białek homologicznych, aktywnych wobec proteaz należących do rodziny C1A (rodzina papainy). Cystatyny dzielą się na trzy grupy, oparte na różnicach strukturalnych, ich dystrybucji w organizmie i rolach fizjologicznych.

- Grupa 1 (cystatyny A i B) są to polipeptydy, posiadające około 100 reszt aminokwasowych, u których stwierdzono brak wiązań dwusiarczkowych i węglowodanowych łańcuchów bocznych. Występują one głównie wewnątrzkomórkowo, ale pojawiają się również w płynach ustrojowych w znacznych stężeniach,
- Grupa 2 obejmuje cystatyny C, D, E, M, F, G, S, SN, SA, charakteryzujące obecnością dwóch mostków siarczkowych, większym rozmiarem cząsteczki (około 120 reszt aminokwasowych) oraz obecnością peptydu sygnałowego. Cystatyny należące do tej grupy występują w płynach ustrojowych,
- Grupa 3 zawiera kininogeny, wewnątrznaczyniowe białka, o wysokiej masie cząsteczkowej, obecne w surowicy, biorące udział w procesach krzepnięcia krwi.

Cystatyny funkcjonują jako ochrona przed lizosomalnymi peptydazami, uwalniającymi się przy naturalnej śmierci komórki lub uwalnianymi „celowo” poprzez proliferujące komórki nowotworowe czy pasożyty [14]. Cystatyny hamują proteazy cysteinowe poprzez bezpośrednią interakcję z ich miejscem aktywnym. Są zaangażowane w wiele funkcji, takich jak odpowiedź na bodźce środowiskowe, mobilizacja substancji zapasowych, programowana śmierć komórki, przetwarzanie lub degradacja białek lub regulacja metabolizmu [16].



Rys. 3. Różnorodne funkcje biologiczne cystatyn [17].

2.2. Klitocypina

Klitocypina występuje w dużych ilościach w owocnikach *Clitocybe nebularis* (gąsówka mglista, lejkówka mglista). Jest to pierwszy inhibitor białkowy proteaz cysteinowych, odkryty i scharakteryzowany w grzybach wyższych. Białko tworzy niekowalencyjny homodimer, który hamuje proteazy, należące do rodziny C1 jak np. papaina, katepsyny L i B. Sekwencja aminokwasów dla klitocypiny została określona zarówno poprzez zastosowanie metod sekwencjonowania białka jak i klonowania genów [14].

Enzym ten jest niezwykle termostabilny i odporny na środki denaturujące oraz degradację proteolityczną. Klitocypina nie wykazuje żadnego znaczącego podobieństwa na poziomie sekwencji (152 a.a.) do innych znanych inhibitorów peptydazowych lub innych białek w bazach danych. Została przypisana jako jedyny członek rodziny I48 w klasyfikacji MEROPS. Początkowo zaobserwowano że, białko i otrzymane sekwencje cDNA różniły się siedmioma resztami aminokwasowymi [2].

2.3. Rodzina białek hamujących apoptozę (IAP)

Programowana śmierć komórek jest procesem regulowanym przez wiele czynników. Zachowanie równowagi pomiędzy procesem proliferacji komórek a ich apoptozą jest niezbędne do utrzymania właściwej liczby komórek w okresie rozwoju organizmu oraz dla zachowania ich proporcji w tkankach dojrziałych. Aktywacja kaspaz jest podstawowym elementem rozpoczynającym proces apoptozy.

Białka IAP (inhibitor of apoptosis protein family) zbudowane są z łańcuchów o długości około 150–1500 aminokwasów. Cechą charakterystyczną tych białek jest obecność dwóch domen:

- BIR (baculoviral IAP-like repeats) na końcu N,
- RING (really interesting new gene) na końcu C,

Białka rodziny IAP mogą tworzyć kompleksy z białkami uczestniczącymi w procesie apoptozy. U ssaków wykazano obecność wielu białek należących do rodziny IAP:

- XIAP (X chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein) inhibitor apoptozy sprzężony z chromosomem X,
- cIAP1 (Cellular inhibitor of apoptosis proteins 1) pierwszy komórkowy inhibitor apoptozy,
- cIAP2 (Cellular inhibitor of apoptosis proteins 2) drugi komórkowy inhibitor apoptozy,
- liwina,
- surwiwina.

Większość białek IAP ma zdolność do hamowania aktywności kaspaz wykonawczych 3 i 7 oraz kaspazy inicjatorowej 9. Mechanizm działania kaspaz opisano dzięki wykryciu białek, wykazujących stosunki antagonistyczne względem rodziny IAP takich jak: Smac/DIABLO, XAF1 i HtrA2/Omi [18].

2.3.1. Surwiwina

Surwiwina jest wielofunkcyjnym białkiem, hamującym apoptozę, reguluje podziały komórkowe oraz zwiększa tempo angiogenezy. Jest członkiem rodziny inhibitorów apoptozy I32 (IAP), które specyficznie hamują kaspazy 3, 7 i 9. Białka z rodziny IAP charakteryzują się obecnością co najmniej jednej domeny BIR (baculovirus IAP repeat). Domena ta zawiera od 70 do 80 aminokwasów i po raz pierwszy została zidentyfikowana w bakulowirusach. Niektóre białka należące do rodziny IAP posiadają domenę RING zawierającą siedem reszt cysteiny i jedną histydynę, którą mogą koordynować dwa atomy cynku. Alternatywny splicing ludzkiego genu surwiwiny może powodować powstanie pięciu różnych izoform białka:

- surwiwinę typu dzikiego,
- surwiwinę 2B,
- surwiwinę-Ex3,
- surwiwinę 3B,
- oraz surwiwinę 2a [19].

Istniejącą w różnych formach molekularnych, surwiwinę możemy znaleźć w różnych przedziałach subkomórkowych. Przy użyciu metod immunohistochemicznych zlokalizowano dwa różne skupiska surwiwiny: w jądrze komórkowym oraz w cytoplazmie. Enzym ten zlokalizowano w mitochondriach, pochodzących z komórek nowotworowych, w których po uwolnieniu do cytoplazmy, hamował śmierć komórek [19].

3. Proteazy cysteinowe i ich inhibitory jako narzędzia w rolnictwie, medycynie i biotechnologii

Peptydazy i ich inhibitory są obecne w każdym organizmie w warunkach homeostazy oraz w stanach patologicznych. Występuje ścisła korelacja pomiędzy proteazami a poziomem ich naturalnych inhibitorów. Właściwa kontrola działania proteaz poprzez ich inhibitory jest bardzo ważna, niekontrolowana aktywność enzymów może prowadzić do wielu stanów chorobowych. Nic więc dziwnego, że temat ten spotyka się ze zwiększonym zainteresowaniem naukowców pracujących nad możliwością wykorzystania ich w medycynie, biotechnologii i rolnictwie [20].

3.1. Wykorzystanie inhibitorów proteaz cysteinowych pochodzenia roślinnego w rolnictwie

Cystatyny są to białkowe inhibitory proteaz cysteinowych, które zostały zidentyfikowane w roślinach i zwierzętach. Te pochodzenia roślinnego, znane są jako fitocystatyny. Większość z nich to małe białka mieszczące się w przedziale od około 12 do 16 kDa. Kilka fitocystatyn wyizolowano z gatunków takich jak soja, kukurydza i jęczmień. Wykazują one zmienne wzory ekspresji podczas rozwoju rośliny oraz w czasie reakcji obronnych na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe. Przejawiają one szeroki zakres aktywności inhibitorowych

wobec różnych proteaz cysteinowych. Uważa się, że fitocystatyny biorą udział w regulacji aktywności endogennych proteaz cysteinowych podczas rozwoju nasion, w procesie kiełkowania, programowanej śmierci komórkowej oraz w proliferacji komórek roślinnych. Ponadto, uczestniczą również w ochronie roślin przed insektami i patogenami. Badania *in vitro* wykazały, że fitocystatyny są inhibitorami dla proteinaz, znajdujących się w jelitach owadów. Natomiast badania prowadzone *in vivo*, ujawniły zwiększoną odporność przeciwko insektom, nicieniom i wirusom w roślinach transgenicznym z nadekspresją genu fitocystatyny. Przeciwwgrzybiczną aktywność tego inhibitora odnotowano w trzcinie cukrowej, truskawkach, pszenicy. Mechanizm działania, dzięki któremu hamowany jest wzrost grzybnii nie jest jeszcze do końca wyjaśniony [21].

Szarłat koński (*Amaranthus hypochondriacus*) jest starożytną uprawą pochodzącą z kontynentu amerykańskiego. Roślina ta charakteryzuje się wysoką wartością odżywczą. Często jest uprawiany jako alternatywa dla zbóż ze względu na wysoką wydajność plonów oraz to, że można go uprawiać na glebach nieplodnych i w warunkach niedoboru wody. Pomimo tego, że uprawa szarłatu została ograniczona do kilku specyficznych obszarów, stanowi on potencjalne źródło genów używanych w walce ze szkodnikami roślin. Inhibitor proteaz cysteinowych, wyizolowany z *Amaranthus hypochondriacus* (AhCPI) jest białkiem o masie ok. 24 kDa. Jego ekspresja jest zwiększana poprzez suszę, zasolenie oraz niskie temperatury. Aby uzyskać zrekombinowany inhibitor, jego sekwencję kodującą uzyskaną metodą PCR, wklonowano w wektor pQE-2. Konstrukcję taką wprowadzono do bakterii *E. coli* (szczep M15). Późniejsze analizy wykazały spadek aktywności proteolitycznej papainy, ficyny i katepsyny-L wraz ze wzrostem stężenia inhibitora [21].

Wykazano, iż inhibitor pochodzący ze szarłatu może być pomocny w zwalczaniu fitopatogennych grzybów: *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum*, oraz *Rhizoctonia solani*, powodujących szkody w plonach roślin uprawnych. AhCPI hamuje wzrost tych grzybów, ale efekt jego działania jest zależny od gatunku grzyba. [21].

3.2. Wykorzystanie proteaz cysteinowych jako przeciwpasożytniczych antygenów w szczepionkach DNA

Organizmy prowadzące pasożytniczy tryb życia takie jak: ameby, tasiemce, przywry, w odróżnieniu od bakterii czy wirusów są bardziej skomplikowane, mogą być zarówno jedno jak i wielokomórkowe. Ich wielkość waha się w granicach od kilku mikrometrów nawet do kilku metrów, a ich powierzchnia zewnętrzna jest bardzo zróżnicowana. Wywołują one złożone reakcje immunologiczne, które są zazwyczaj wielopłaszczyznowe oraz zależą od rodzaju pasożyta. Od wielu lat prowadzone są szczegółowe badania nad szczepionkami przeciwko tym organizmom. Szczepionki takie zazwyczaj

zawierają kilka antygenów w połączeniu z substancjami pomocniczymi. Używane są głównie białka powierzchniowe tych organizmów, jednakże ostatnie badania pokazują, że enzymy takie jak proteazy również mogą być pomocne. Okazało się, że proteazy cysteinowe są enzymami niezbędnymi w cyklu życiowym pasożytów, m. in. ułatwiają migrację do organizmu gospodarza. Pomimo tego, że enzymy te ułatwiają przeżycie pasożyta wewnątrz organizmu gospodarza, są również silnie immunogenne, co czyni je potencjalnie użytecznymi w badaniach nad szczepionkami. Szczepienia z wykorzystaniem DNA są bardzo ciekawym sposobem na wywołanie odporności immunologicznej w organizmie gospodarza, który przy wykorzystaniu swojej własnej maszyneryi komórkowej produkuje antygeny, prowadzące do uzyskania odporności. Taka strategia szczepień ma również inne zalety, jest bardzo bezpieczna i tania [5].

Pasożytnicze proteazy cysteinowe to enzymy funkcjonalnie zróżnicowane, zaangażowane w procesy omijania systemów obronnych organizmu gospodarza, aktywację enzymów, inwazję do komórek i tkanek. Geny kodujące te enzymy stanowią około 2% całej zawartości genomu komórek [5].

Działanie pasożytów jest skomplikowane, często wywołują przewlekłą chorobę oraz stan obniżonej odporności immunologicznej. Szczepienia DNA stanowią metodę ochrony gospodarza poprzez oddziaływanie na organizm pasożyta. Zaletą szczepionek DNA jest aktywacja pełnej reakcji układu odpornościowego przeciw antygenowi, natomiast szczepionki białkowe zwykle aktywują tylko reakcję przeciwciał. Szczepionki genetyczne mogą indukować zarówno odpowiedź komórkową, jak i humoralną. Reakcje te obejmują aktywację limfocytów T cytotoksycznych, prezentujących na swojej powierzchni antygeny CD8 oraz limfocytów T pomocniczych, prezentujących antygeny CD4. Kolejną zaletą takich szczepionek jest możliwość łączenia genów kodujących różne antygeny w jeden konstrukt. W ten sposób podczas jednego zastrzyku można zastosować wielofunkcyjną szczepionkę.

DNA dostaje się do komórek [zazwyczaj są to miocyty (komórki mięśniowe) oraz komórki prezentujące antygen (APC – antigen presenting cells)] i stamtąd jest transportowany do jądra. Wewnątrz jądra zachodzi inicjacja transkrypcji i mRNA jest transportowane poza jądro komórkowe. Następnie w cytoplazmie produkowane są białka i przechodzą modyfikacje potranslacyjne. Obce białka będą prezentowane poprzez antygeny zgodności tkankowej MHC I oraz MHC II, co prowadzi do wywołania zarówno odpowiedzi humoralnej, jak i komórkowej. Szczepionki DNA skierowane przeciwko infekcjom wirusowym i bakteryjnym są bardzo liczne, jednakże niewiele z nich jest oparte o użycie proteaz cysteinowych.

- Ameby – *Entamoeba histolytica* powoduje zapalenie jelita grubego. Badania prowadzone na myszach wykazały, że wrażliwość na tę chorobę wiąże się z odpowiedzią typu Th2 a reakcje ochronne połączone są z odpowiedzią immunologiczną Th1. Reakcja obronna odpowiedzi Th1 została zaobserwowana w wątrobie chomika po szczepieniu przeciw E.

histolytica szczepionką, zawierającą proteazę cysteinową (EhCP112). Proteaza ta jest uznawana jako jedna z ważniejszych przy zakażeniu *E. histolytica*,

- Tasiemce – wykazano, że szczepienia przeciwko *Taenia solium*, prowadzone na myszach przy użyciu oczyszczonej proteazy cysteinowej, powiodły się. Szczepienie ujawniło 72 procentową skuteczność oraz proliferację limfocytów specyficznych antygenowo,
- Haemosporidia – kilka proteaz cysteinowych występuje w pasożytach, wywołujących malarię (np. *Plasmodium* sp.), najlepiej scharakteryzowaną jest falcypaina. Prowadzono próby szczepień na myszach z wykorzystaniem zrekombinowanej falcypainy-1. Dowiedziono częściowej odporności przeciwko zakażeniom, spowodowanym poprzez *Plasmodium yoelii*,
- Przywry – po podaniu szczepionki, zawierającej katepsynę – L szczurom, zaobserwowano znaczną poprawę odporności przeciwko motylicy wątrobowej.

Pomimo wielkiego potencjału szczepionek DNA, technologia ta nie jest tak rewolucyjna jak oczekiwano u ssaków. Jednakże nowe techniki, optymalizacja ekspresji białek i odkrycie nowych antygenów mogą zwiększyć potencjał tej metody. Celem jest stworzenie szczepionek, które w bezpieczny sposób są w stanie skierować system immunologiczny do najbardziej skutecznej reakcji obrony gospodarza przed konkretnymi organizmami patogennymi [5].

3.3. Wykorzystanie ssaczej cystatyny C przy oznaczaniu zapalenia kanalików nerkowych

Cystatyna C (cys C) jest inhibitorem proteaz cysteinowych. Ludzka cystatyna C to niewielkie białko zasadowe, o masie 13,343 – 13,359 kDa, wytwarzane przez wszystkie komórki jądrzaste organizmu. Składa się z 120 reszt aminokwasowych i posiada dwa wiązania disiarczkowe: Cys 73–83 i Cys 97–117. Cystatyna C wykazuje silne właściwości hamujące względem proteaz cysteinowych, należących do rodzin C1 i C13 (odpowiednio: papainy i leguminy). Ekspresja tego inhibitora w komórce obejmuje aparat Golgiego i siateczkę śródplazmatyczną. Występuje on w dwóch postaciach:

- jako dimer – wewnątrzkomórkowo (zapewnia ochronę przed proteazami),
- jako monomer – (w płynach ustrojowych). Tylko forma monomeryczna jest zdolna do hamowania aktywności peptydaz cysteinowych, dimeryzacja w płynach ustrojowych jest uważana za zjawisko patologiczne [22].

Główne funkcje cystatyn to ochrona przeciwbakteryjna, przeciwgrzybiczna, modulacja systemu odpornościowego, hamowanie aktywności proteaz cysteinowych pochodzenia endogennego i egzogennego, co chroni organizm przed ich niekontrolowanym działaniem. Cystatyna C jest regulatorem proteolizy pozakomórkowej, dzięki swoim właściwościom inhibitoryjnym względem katepsyn: B, H, L i S. Zakłócenie stanu równowagi fizjologicznej pomiędzy peptydazami a ich inhibitorami może być przyczyną powstawania

stanów patologicznych. Zaburzoną równowagę pomiędzy peptydazami cysteinowymi i ich inhibitorami zaobserwowano w procesie przebudowy tkanki łącznej w zapaleniu płuc oraz w przypadku reumatoidalnego zapalenia stawów, gdzie w miejscach destrukcji kości i stawów wykryto zwiększone stężenie cystatyny C oraz katepsyny B [22].

Tabela 3. Stężenie cystatyny C w płynach ustrojowych oraz stany patologiczne związane ze wzrostem i obniżeniem jej stężenia [22]

Fizjologiczne średnie stężenia cysC w płynach ustrojowych (mg/l)	płyn nasienny – 51; płyn mózgowo-rdzeniowy – 5,8; mleko – 3,3; ślina – 1,8; surowica/osocze – 0,96; mocz – 0,095
Stany patologiczne związane ze wzrostem stężenia cystatyny w surowicy/osoczu	choroby nerek, zakażenia, choroby nowotworowe (w okresie przerzutowania oraz chemioterapii), choroby tarczycy, leczenie kortykosteroidami, miażdżyca, zespół sercowo-nerkowy
Stany patologiczne związane z obniżonym stężeniem cystatyny	tętniaki aorty brzusznej (w osoczu) reumatoidalne zapalenie stawów (w płynie stawowym), choroba Alzheimera (w płynie mózgowo-rdzeniowym)

Nerki odgrywają główną rolę w metabolizmie cys C. Jest ona swobodnie przesączana przez filtr kłębuszkowy dzięki swojej małej masie, następnie wchłaniana jest w procesie endocytozy przez komórki rąbka szczoteczkowego kanalików proksymalnych, gdzie ulega całkowitej degradacji. Wolne aminokwasy powracają do krążenia a niewielka ilość niezmetylizowanej cys C tafia do moczu, dlatego prawidłowe stężenie cys C w moczu jest niewielkie i waha się w przedziale 0,03–0,3 mg/l. Zmniejszoną reabsorpcję cys C zaobserwowano podczas zaburzeń w funkcjonowaniu kanalików proksymalnych, co wpływało na zwiększenie jej wydalania z moczem. W takich przypadkach zwiększenie stężenia może być nawet 200-krotne, co daje możliwość wykorzystania tego białka jako markera przy oznaczaniu uszkodzenia kanalików proksymalnych. Korzystnymi cechami tej metody są możliwość łatwego pobierania próbek moczu do badań oraz krótki czas oczekiwania na wyniki, co jest bardzo ważne dla pacjentów w ciężkim stanie. Z tych powodów oznaczanie cys C powinno stać się rutynowym badaniem przeprowadzanym w ośrodkach opieki medycznej [22].

3.4. Cystatyny i proteazy cysteinowe jako markery chorób nowotworowych

Istotną rolę w wielu procesach patofizjologicznych odgrywa równowaga pomiędzy aktywnością peptydaz cysteinowych i stężeniem ich inhibitorów. Komórki guza wydzielają zarówno proteazy cysteinowe, jak i cystatyny. Wiele nowotworom towarzyszy również naciek zapalny złożony m. in. z makrofagów i leukocytów, będących źródłem proteaz i ich inhibitorów. Wykazano, że oznaczanie aktywności proteaz cysteinowych oraz cystatyn może być pomocne w monitorowaniu przebiegu chorób nowotworowych [3].

Tabela 4. Proteazy cysteinowe i ich inhibitory wykorzystane jako czynniki diagnostyczne w różnych chorobach nowotworowych. Opracowanie własne na podstawie [3]

Rodzaj schorzenia	Opis	Użyty marker
Nowotwory mózgu	<i>Meningioma</i> to grupa zazwyczaj łagodnych nowotworów wywodzących się z opon mózgowych zwanych oponiakami. Około 10% tych guzów może przerodzić się w postać klinicznie złośliwą. Do odróżnienia formy inwazyjnej od nieinwazyjnej posłużyło oznaczenie poziomu katepsyny B oraz cystatyn.	Katepsyna B – jej wysokie stężenie wskazuje na inwazyjność nowotworu. Cystatyny – wykryto znacznie wyższy poziom cystatyn, w przeciwieństwie do katepsyn w wyciągach z guzów łagodnych.
Nowotwory skóry	Dojrzałe keratynocyty produkują cystatynę A. Uważa się, że immunohistochemiczna analiza cystatyny A, a także katepsyny L może być praktycznie wykorzystana do oznaczania złośliwości nowotworów wywodzących się z nabłonkowych keratynocytów.	Cystatyna A – wysoka zawartość w wycinkach ze skóry prawidłowej. Umiarkowane stężenie w komórkach nowotworów płaskonabłonkowych
Nowotwory gruczołu krokowego	W diagnostyce gruczolaka prostaty może być przydatne oznaczanie wydzielanie cystatyny A oraz B.	Cystatyna A – wykazano jej ekspresję w komórkach podstawnych

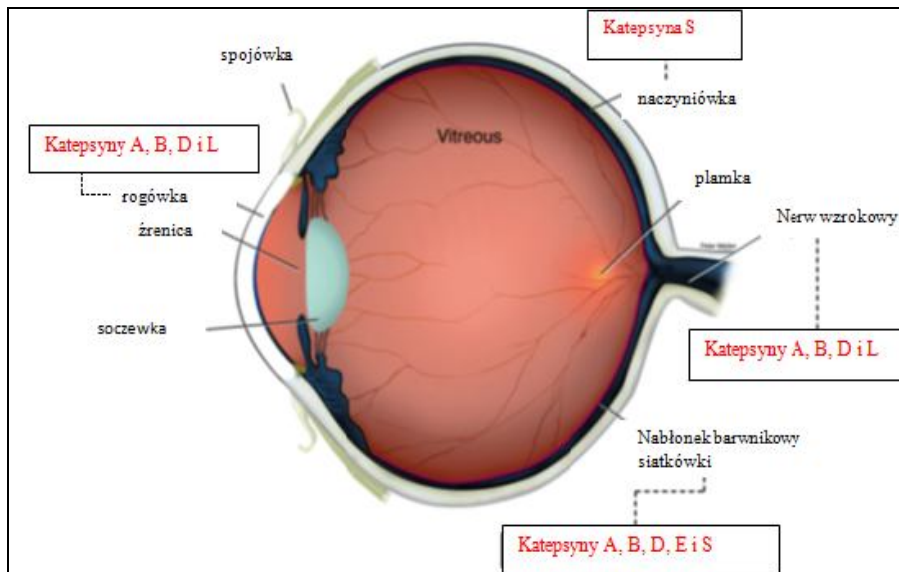
		prawidłowej prostaty. Stężenie w raku gruczołu krokowego maleje. Cystatyna B– wykazano jej obecność zarówno w jądrze jak i cytoplazmie prawidłowych komórek prostaty. Obniżenie zawartości odnotowano w komórkach nowotworowych.
Nowotwory jelita grubego	W diagnostyce raka jelita grubego przy użyciu przeciwciał monoklonalnych oznaczano kompleks katepsyna B cystatyna C.	Kompleks katepsyna B/ cystatyna C – wykazano wysokie stężenie kompleksu w nowotworach o wyższym stopniu zaawansowania.
Nowotwory płuc	Stwierdzono że przydatne w diagnostyce chorób płuc i opłucnej może być oznaczenie cystatyny C.	Kompleks katepsyna B/ cystatyna C – zauważono znacznie obniżenie stężenia kompleksu u pacjentów z chorobami nowotworowymi płuc w porównaniu do próby kontrolnej.
Nowotwory gruczołu piersiowego	Do oznaczania komórek raka piersi jako marker posłużyły katepsyna L oraz jej inhibitory ponieważ brak równowagi pomiędzy nimi jest przyczyną rozwoju złośliwego fenotypu komórek nowotworowych.	Katepsyna L– wzrost stężenia związany z inwazyjnością komórek raka piersi. Stefina A i B– w przeciwieństwie do katepsyn, spadek stężenia związany z inwazyjnością komórek raka piersi.

3.5. Wykorzystanie papainy w kosmetyce

Papaina jest enzymem wykorzystywanym w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i kosmetycznym. Przeprowadzono badania mające na celu wykazanie przydatności tego enzymu np. w środkach depilujących. Opracowano preparaty w formie żelu i kremu zawierające papainę i stosowano codziennie przez miesiąc na dwóch grupach myszy. Oceniono skuteczność produktu poprzez analizę histologiczną metodą mikroskopii świetlnej. Efekt depilacji żelem w pierwszej grupie był mniej zauważalny. W grupie drugiej, w której stosowano krem, zauważono bardziej intensywny efekt depilacji. Morfometryczna analiza wykazała poszerzenie o około 55% światła mieszka włosowego i wzrost grubości naskórka. Celem tego badania było potwierdzenie skuteczności preparatu do depilacji. Nie stwierdzono czy takie działanie jest długotrwałe. Postuluje się, że ciągle użytkowanie tego preparatu może osłabić mieszki włosowe i hamować wzrost włosów [23].

3.6. Rola katepsyn w diagnozowaniu stanów fizjologicznych i patologicznych gałki ocznej

Katepsyny znajdują się w różnych miejscach w obrębie oka, włączając trzy warstwy rogówki, komórki nabłonka barwnikowego siatkówki, nerw wzrokowy i naczyńówkę [24].



Rys. 7. Lokalizacja katepsyn w gałce ocznej [24]

Fizjologiczna i patologiczna rola katepsyn:

- Rogówka – w rogówce katepsyny A, B, D i L obecne są w lizosomach nabłonkowych, komórkach podścieliska i śródbłonka. Zwiększona

aktywność lub ekspresja różnego rodzaju katepsyn występuje w stanach chorobowych rogówki. Zwiększona ich ilość pojawia się podczas zakażeń bakteryjnych np. podczas zakażenia rogówki *Pseudomonas aeruginosa* (pałeczka ropy błękitnej), zaobserwowano zwiększoną aktywność katepsyn B, D i L, co związane było z późniejszą reakcją zapalną, degradacją macierzy zewnątrzkomórkowej, w wyniku której doszło do uszkodzenia rogówki. Blokowanie aktywności katepsyn może być odpowiednim sposobem na spowolnienie zmian chorobowych w rogówce,

- Siatkówka, nabłonek barwnikowy, naczyńniówka – katepsyny D znajdujące się w lizosomach nabłonka barwnikowego, odpowiadają za degradację fotoreceptorów w procesie ich odnawiania. Badania prowadzone na szczurach wykazały, że podsiatkówkowy zastrzyk zawierający antysensowną katepsynę S spowodował utratę fotoreceptorów u tych zwierząt. Deregulacja aktywności katepsyn może być czynnikiem wywołującym różnorakie zmiany zwyrodnieniowe w siatkówce np. związane z wiekiem zwyrodnienie plamki żółtej. Katepsyny są niezbędne w utrzymaniu homeostazy fotoreceptorów, jednakże mogą być również odpowiedzialne za zachodzące zmiany chorobowe. Proces, podczas którego enzymy te stają się szkodliwe, nie jest jeszcze do końca poznany,
- Nerw wzrokowy – katepsyny mogą być czynnikiem przyczyniającym się do powstania jaskry poprzez wywoływanie zmian w poziomie endoteliny, generującej zmiany patologiczne nerwu wzrokowego. Wykryto podwyższone stężenie endoteliny-1 w cieczy wodnistej u osób chorujących na jaskrę [24].

Cystatyny to inhibitory proteaz cysteinowych, w tym katepsyn, równowaga pomiędzy enzymami i ich inhibitorami jest kluczowym czynnikiem wpływającym na fotoreceptory oraz zapobiegającym jaskrze. Zaobserwowano, że zmniejszenie aktywności katepsyn ma wpływ na unaczynnienie guzów, co wskazuje na fakt, że związane są one z procesem angiogenezy [24].

Katepsyny są obecne w różnych miejscach w oku. W niezmiennych chorobowo tkankach odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy, jednakże w komórkach zmienionych chorobowo wpływają na degradację białek i rozwój stanów zapalnych. Odpowiednie izoformy katepsyn prawdopodobnie mogą posłużyć jako cel w terapii chorób nowotworowych [24].

4. Podsumowanie

Istotą niniejszej pracy było przedstawienie proteaz cysteinowych i ich inhibitorów jako enzymów potencjalnie użytecznych w różnych dziedzinach nauki. Dzięki zaawansowanym metodom technologicznym udaje się pozyskać coraz więcej informacji o tych enzymach, co pozwoliło umieścić i opisać wybrane zagadnienia w przedstawionej pracy. Wybrany temat jest bardzo obszerny, co stwarza szansę na szeroki wachlarz przyszłych możliwości aplikacyjnych dla tej grupy czynników.

Literatura

1. H. J. Atkinson, P. C. Babbitt, i M. Sajid, „The global cysteine peptidase landscape in parasites”, *Trends Parasitol.*, t. 25, nr 12, ss. 573–581, grudz. 2009.
2. J. Sabotič i J. Kos, „Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, t. 93, nr 4, s. 1351–1375, luty 2012.
3. A. Wyrwińska i L. Trolński, „Proteazy cysteinowe i cystatyny w chorobach nowotworowych. Część I. diagnostyczna i prognostyczna wartość oznaczania cystatyn i/lub proteaz cysteinowych”, *Now. Lek.*, nr 73, s. 228 – 233, 2003.
4. P. J. Rosenthal, „Cysteine proteases of malaria parasites”, *Int. J. Parasitol.*, t. 34, nr 13–14, ss. 1489–1499, grudz. 2004.
5. L. von G. Jørgensen i K. Buchmann, „Cysteine proteases as potential antigens in antiparasitic DNA vaccines”, *Vaccine*, t. 29, nr 34, ss. 5575–5583, sie. 2011.
6. H.–H. Otto i T. Schirmeister, „Cysteine proteases and their inhibitors.”, *Chem. Rev.*, t. 97, nr 1, s. 133, 1997.
7. „<http://merops.sanger.ac.uk/>”.
8. N. D. Rawlings, A. J. Barrett, i A. Bateman, „MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors”, *Nucleic Acids Res.*, t. 40, nr Database issue, ss. D343–350, sty. 2012.
9. M. Szabelska, E. Gospodarek, i E. Ciok–Pater, „Apoptoza u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*– mechanizm śmierci czy przetrwania?”, *Postępy Mikrobiol.*, nr 47, s. 111 – 117, 2007.
10. A. Szabó, M. Kotormán, I. Laczkó, i L. M. Simon, „Spectroscopic studies of stability of papain in aqueous organic solvents”, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, t. 41, nr 1–2, ss. 43–48, lip. 2006.
11. M. Cygler i J. S. Mort, „Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity”, *Biochimie*, t. 79, nr 11, ss. 645–652, lis. 1997.
12. S. K. Rupinder, A. K. Gurpreet, i S. Manjeet, „Cell suicide and caspases”, *Vascul. Pharmacol.*, t. 46, nr 6, ss. 383–393, cze. 2007.
13. K. Brix, A. Dunkhorst, K. Mayer, i S. Jordans, „Cysteine cathepsins: Cellular roadmap to different functions”, *Biochimie*, t. 90, nr 2, ss. 194–207, luty 2008.
14. G. Dubin, „Proteinaceous cysteine protease inhibitors”, *Cell. Mol. Life Sci.*, t. 62, nr 6, ss. 653–669, mar. 2005.
15. U. S. Ndidi i H. C. Nzeli, „Purification and Characterization of a Cysteine Protease from the Bulb of Common Onion *Allium cepa* L.(cv. Red Creole)”, *Int J Mod. Biochem*, t. 1, nr 1, ss. 1–17, 2012.
16. D.–Y. Jung, O. R. Lee, Y.–J. Kim, J.–H. Lee, R. K. Pulla, G. Sathiyaraj, J.–S. Shim, I D.–C. Yang, „Molecular characterization of a cysteine proteinase inhibitor, PgCPI, from *Panax ginseng* C. A. Meyer”, *Acta Physiol. Plant.*, t. 32, nr 5, ss. 961–970, wrz. 2010.
17. D. Keppler, „Towards novel anti–cancer strategies based on cystatin function”, *Cancer Lett.*, t. 235, nr 2, ss. 159–176, kwi. 2006.
18. O. Grzybowska–Izydorczyk i P. Smolewski, „The role of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family in hematological malignancies”, *J. Cover*, t. 67, 2013.
19. M. J. Duffy, N. O'Donovan, D. J. Brennan, W. M. Gallagher, i B. M. Ryan, „Survivin: A promising tumor biomarker”, *Cancer Lett.*, t. 249, nr 1, ss. 49–60, kwi. 2007.

20. J. Sabotič, K. Galeša, T. Popovič, A. Leonardi, i J. Brzin, „Comparison of natural and recombinant cliticypins, the fungal cysteine protease inhibitors”, *Protein Expr. Purif.*, t. 53, nr 1, ss. 104–111, maj 2007.
21. S. Valdes–Rodríguez, A. Cedro–Tanda, V. Aguilar–Hernandez, E. Cortes–Onofre, A. Blanco–Labra, i A. Guerrero–Rangel, „Recombinant amaranth cystatin (AhCPI) inhibits the growth of phytopathogenic fungi”, *Plant Physiol. Biochem.*, t. 48, nr 6, ss. 469–475, cze. 2010.
22. M. Warwas i A. Piwowar, „Moczowa cystatyna C jako biomarker uszkodzenia kanalików nerkowych Urinary cystatin C as a biomarker of renal tubular injury”, *J. Cover*, t. 67, 2013.
23. E. Traversa, G. M. Machado–Santelli, i M. V. R. Velasco, „Histological evaluation of hair follicle due to papain’s depilatory effect”, *Int. J. Pharm.*, t. 335, nr 1–2, s. 163–166, kwi. 2007.
24. E. Im i A. Kazlauskas, „The role of cathepsins in ocular physiology and pathology”, *Exp. Eye Res.*, t. 84, nr 3, ss. 383–388, mar. 2007.

**Pracę recenzowała: dr hab. Krzysztof Grzywnowicz, Uniwersytet
Marii Curie–Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii**

Perspektywy wykorzystania proteaz cysteinowych i ich inhibitorów w biotechnologii i medycynie

Proteazy, czyli enzymy proteolityczne są podklasą enzymów z klasy hydrolaz, katalizującą hydrolityczny rozkład wiązania peptydowego. Ze względu na mechanizm katalizy, wg klasyfikacji MEROPS wyróżniono proteazy aspartylowe, cysteinowe, glutaminowe, metaloproteazy, asparaginowe, serynowe i treoninowe.

Proteazy cysteinowe, reprezentują klasę peptydaz charakteryzujących się obecnością reszty cysteinowej w miejscu katalitycznym enzymu, proteazy te są związane z prawidłowym rozkładem i przetwarzaniem białek. Natomiast substancje hamujące aktywność proteaz to m. in. białkowe inhibitory proteaz. Powszechnie znanymi inhibitorami proteaz cysteinowych są cystatyny, podzielone na trzy rodziny: typ I (stefiny), typ II (cystatyny właściwe) i typ III (kininogeny).

Proteazy cysteinowe i ich inhibitory są z powodzeniem stosowane w biotechnologii, rolnictwie i medycynie. Przykładami możliwości aplikacyjnych mogą być: a) inhibitor proteaz cysteinowych pochodzący z szarlatu końskiego (*Amaranthus hypochondricatus*), pomocny w zwalczaniu grzybów fitopatogennych (*Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum*, *Rhizoctonia solani*), powodujących znaczne szkody w plonach roślin uprawnych, b) szczepionki DNA wykorzystujące proteazy cysteinowe jako antygeny, stanowiące metodę ochrony gospodarza poprzez bezpośrednie oddziaływanie na organizm pasożyta, c) ssacza cystatyna C jako marker zapalenia kanalików nerkowych, d) oznaczanie aktywności proteaz cysteinowych i ich inhibitorów może służyć jako czynnik diagnostyczny w różnych chorobach nowotworowych (nowotwory mózgu, skóry, płuc, układu krwiotwórczego), e) oznaczanie aktywności katepsyn może stać się pomocne w medycynie, zwiększona ich ilość występuje w stanach chorobowych rogówki, siatkówki, naczyńówki oraz nerwu wzrokowego. Nie powinno więc dziwić wzmożone zainteresowanie badaczy tego typu substancjami jak również próby aplikacji w medycynie i biotechnologii.

Prospects of cysteine proteases and their inhibitors in biotechnology and medicine

Proteases are a subclass of enzymes from the class of hydrolases which catalyzes the hydrolytic breakdown of the peptide bond. Due to the mechanism of catalysis, according to MEROPS the following can be distinguished: aspartyl, cysteine, glutamine, metalloproteinases, aspartic, serine and threonine proteases.

Cysteine proteases represent a class of peptidases characterized by the presence of cysteine residue in the catalytic site of the enzyme. These proteases are associated with the normal degradation and processing of proteins. The substances that inhibit the activity of proteases include protein protease inhibitors, among others. Among well-known inhibitors of cysteine proteases there are cystatins, divided into three families: type I (stephins), type II (proper cystatin) and type III (kininogens).

Cysteine proteases and their inhibitors have been successfully used in biotechnology, agriculture and medicine. Examples of possible applications include: a) an inhibitor of cysteine proteases derived from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*), helpful in combating phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum*, *Sclerotium cepivorum*, *Rhizoctonia solani*), which cause significant damage to the crop yield, b) DNA vaccines using protease cysteine as antigens, constituting a method for the protection of the host by directly affecting the parasite organism, c) a mammalian cystatin C as a marker of kidney tubular inflammation, d) determining the activity of cysteine proteases and their inhibitors can be used as a diagnostic agent in a variety of neoplastic diseases (brain, skin, lung and hematopoietic cancer), e) determining the activity of cathepsins can be helpful in medicine, an increased number of them is present during cornea, retina, choroid and optic nerve diseases. The increased interest of researchers in this type of substances, as well as attempts of application in medicine and biotechnology, should not come as a surprise.

Marcin Chilkiewicz¹, Magdalena Jaszek², Dawid Stefaniuk³,
Anna Matuszewska⁴

Proteazy serynowe i ich inhibitory jako nowoczesne narzędzia wykorzystywane w medycynie i biotechnologii

Wstęp

Proteazy, zwane również peptydazami lub proteinazami, stanowiące podklasę klasy hydrolaz, opisują grupę enzymów, które katalizują hydrolizę wiązań peptydowych. Enzymy te działają specyficznie w stosunku do typu grup funkcjonalnych aminokwasów przy degradowanym wiązaniu. Proteazy to różnorodna grupa białek z odmiennymi mechanizmami katalizy, optimum pH i temperaturowym, z różnym powinowactwem do substratów. Enzymy proteolityczne podzielono na endopeptydazy i egzopeptydazy biorąc pod uwagę miejsce działania w łańcuchu białkowym.

- Endopeptydazy – hydrolizują wiązanie peptydowe wewnątrz łańcucha polipeptydowego,
- Egzopeptydazy – odczepiają pojedyncze aminokwasy od N- i C-końca [1].

Ze względu na mechanizm katalizy enzymy te według systemu MEROPS można podzielić na następujące grupy: peptydazy serynowe, cysteinowe, treoninowe, asparaginianowe, glutaminowe, asparaginowe, metalopeptydazy oraz grupę peptydaz o nieznanym mechanizmie działania (ang. unknown). Każda z tych grup dzieli się na klany, rodziny a następnie na podrodziny (wyjątkiem jest grupa proteaz treoninowych i grupa o nieznanym typie katalitycznym – ang. unknow [2, 3].

Enzymy proteolityczne odgrywają znaczącą rolę w procesach metabolicznych oraz regulacyjnych organizmu. Z tego powodu związki, które hamują ich aktywność (inhibitory), znalazły wiele zastosowań w medycynie, biotechnologii oraz rolnictwie. Mogą brać udział w ochronie roślin przed szkodnikami i patogenami. W medycynie stosowane są jako związki diagnostyczne oraz terapeutyczne przy wykrywaniu i leczeniu chorób grzybiczych, pasożytniczych, bakteryjnych, nowotworowych oraz chorób układu krążenia. Znalazły również zastosowanie przy oczyszczaniu białek [4].

¹chilek90@gmail.com, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Biologii i Biofizyki, Zakład Biochemii

²magdalena.jaszek@poczta.umcs.lublin.pl, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Biologii i Biofizyki, Zakład Biochemii

³dawid.stefaniuk@umcs.pl, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Biologii i Biofizyki, Zakład Biochemii

⁴anna.matuszewska@poczta.umcs.lublin.pl, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Biologii i Biofizyki, Zakład Biochemii

1. Proteazy serynowe

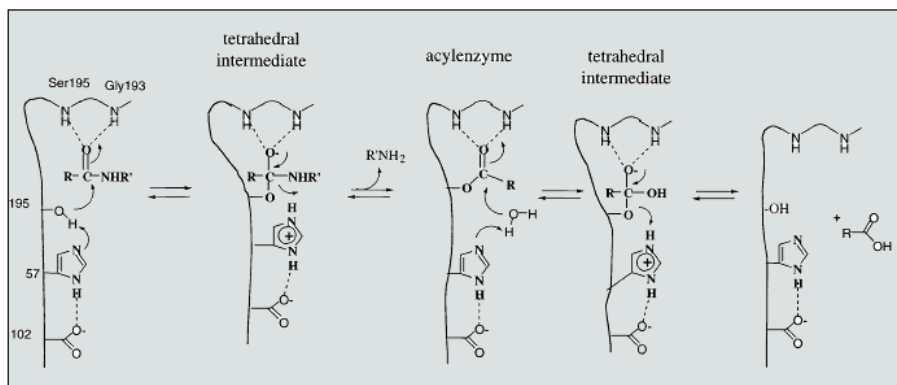
Proteazy serynowe należą do dużej rodziny enzymów, które poprzez rozszczepianie substratów białkowych kontrolują reakcje komórkowe organizmów, zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych. Ich charakterystyczną cechą jest obecność w miejscu aktywnym enzymu seryny i histydyny.

Mechanizm działania tych proteaz oparty jest na przeniesieniu acylowej części substratu do grupy funkcyjnej enzymu. Kataliza składa się z dwóch etapów:

a) utworzenie estru między atomem tlenu seryny a acylową częścią substratu, która uwalnia część amino substratu,

b) atak wody na półprodukt acylo–enzym, który powoduje, że łamie się on i uwalnia podczas regeneracji oryginalnej formy enzymu kwaśne produkty [5]. Mechanizm ten przedstawia (Rys. 1).

Proteazy serynowe pełnią znaczącą funkcję w większości procesów zachodzących w organizmie. Możemy wymienić tu: apoptozę, blokowanie replikacji wirusów, przebudowę macierzy pozakomórkowej (ECM), udział w stanach zapalnych. Proteazy serynowe odgrywają również kluczową rolę w procesach związanych z krzepnięciem krwi. Upośledzenie działania tych enzymów lub ich inhibitorów może powodować występowanie takich objawów jak infekcje wirusowe, powstawanie guzów, narośli nowotworowych, przerzutów nowotworów, chorób autoimmunologicznych, odrzucanie przeszczepów, czy astmę [6].



Rys. 1. Ogólnie przyjęty mechanizm działania proteaz serynowych [7]

1.1. Klasyfikacja

Według systemu MEROPS proteazy serynowe podzielone zostały na 13 klanów: SB, SC, SE, SF, SH, SJ, SK, SP, SQ, SR, SS, ST, nie sklasyfikowane (ang.: unassigned), wśród których wyróżniamy 51 rodzin i 21 podrodzin. Część

enzymów posiadających w miejscu aktywnym serynę została zakwalifikowana do klanów o mieszanym typie katalitycznym, gdyż oprócz seryny w miejscu aktywnym mogą również posiadać cysteinę oraz/lub treoninę. Grupa ta dzieli się na cztery klany: PA, PB, PC, PD. Do enzymów tego typu należą np. trypsyna, chymotrypsyna [2, 3].

Możemy klasyfikować enzymy również w oparciu o podział wprowadzony przez EC (Enzyme Commission). Podaje on szczegółową nomenklaturę enzymów. Każdemu enzymowi przypisano zarekomendowaną nazwę i czterocyfrową rozróżnialną liczbę. Cyfra pierwsza wskazuje na klasę danego enzymu (3 – hydrolazy), druga na podklasę (np. peptydazy należą do podklasy 4), trzecia na podpodklasę. Cyfra czwarta wskazuje na miejsce ułożenia enzymu w danej podpodklasie.

1.2. Charakterystyka wybranych proteaz serynowych

1.2.1. Chymotrypsyna [EC 3.4.21.1]

Chymotrypsyna należy do klanu PA, podklanu PA(S), rodziny S1 – rodziny chymotrypsyn.

W rodzinie S1 możemy wyróżnić trzy rodzaje aktywności:

- aktywność trypsyno-podobna – rozszczepienie substratów poprzez odłączenie dodatnio naładowanej reszty lizyny i argininy,
- aktywność chymotrypsyno-podobna – substraty rozszczepione po dużych hydrofobowych aminokwasach, takich jak leucyna i alanina,
- aktywność elastazo-podobna – substraty zostają rozszczepione po małych hydrofobowych resztach takich jak walina [6].

Wszystkie proteazy wchodzące w skład tej rodziny są endopeptydazami, czyli enzymami tnącymi łańcuch polipeptydowy wewnątrz łańcucha. Chymotrypsyna posiada masę około 27 kDa. Optymalna temperatura działania enzymu wynosi około 50°C, a pH od 7 do 8. Wykazuje stabilność zarówno w pH kwaśnym jak i zasadowym. Enzym ten jest skutecznie hamowany przez inhibitory protez serynowych (np. przez serpiny, ekotyny, aprotyniny) oraz poprzez takie jony metali jak: Fe²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺. Aktywowany jest natomiast pod wpływem jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ [8, 9]. Chymotrypsyna wchodzi w skład skoku trzustkowego ssaków. Jest enzymem trawiennym. Produkowana jest przez trzustkę w postaci nieaktywnego zymogenu – chymotrypsynogenu [2, 3]. Proces przemiany chymotrypsynogenu do chymotrypsyny odbywa się skokowo i zachodzi w dwunastnicy. Przekształcenie formy nieaktywnej w formę aktywną zachodzi pod wpływem trypsyny, która hydrolizuje wiązanie peptydowe Arg15–Ile16.

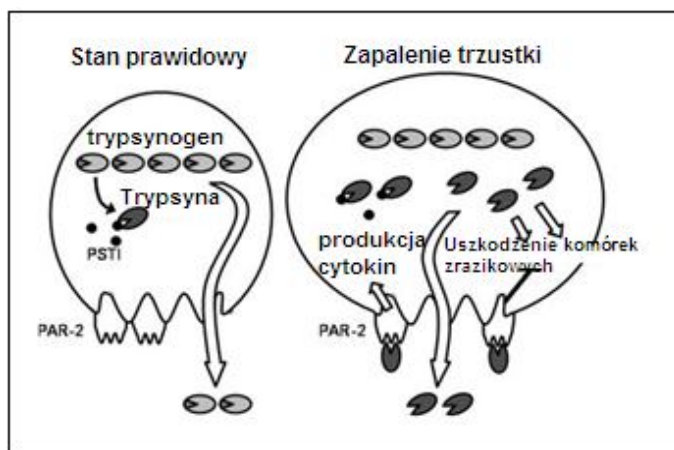
W wyniku tego procesu propeptyd zostaje usunięty. Następnie powstała chymotrypsyna π ulega autolizie (z cząsteczki zostają usunięte dwa dipeptydy: Thr147–Asn148 i Ser14–Arg15). Na skutek tego procesu powstaje chymotrypsyna γ . W wyniku zmiany konformacji cząsteczki chymotrypsyny

γ powstają dwie formy: chymotrypsyna κ oraz chymotrypsyna α , które są w pełni aktywnymi formami enzymu [10].

1.2.2. Trypsyna [EC 3.4.21.4]

Trypsyna jest ważnym enzymem z grupy proteaz serynowych. Należy do klanu PA, podklanu PA(S), rodziny S1 [2, 3]. Jest ona syntetyzowana w komórkach zrazikowych trzustki w postaci proenzymu, a następnie wydzielana do jelita ssaków. Podobnie jak chymotrypsyna, trypsyna jest enzymem trawiennym. Odpowiedzialna jest ponadto za aktywację innych enzymów trawiennych (np. chymotrypsyny), w tym również za autoaktywację [11].

Optymalne działanie trypsyny jest zauważalne w temperaturze około 37 °C i pH od 7,5 do 8,5. Masa enzymu w przybliżeniu wynosi około 24kDa [10].



Rys. 3. Interakcje pomiędzy trypsyną, inhibitorem trypsyny i receptorem trypsyny w początkach i w ostrym zapaleniu trzustki. PAR-2 (ang. protease-activated receptor 2). Opracowano w oparciu o [12].

Nadmierna aktywność trypsyny może spowodować zapalenie trzustki. Dzieje się tak, kiedy aktywność trypsyny przekroczy możliwości hamujące inhibitora wydzielania trypsyny (PSTI). Przyczyną może być nadmierna stymulacja komórek zrazikowych trzustki. W konsekwencji zostaje uruchomiona kaskada reakcji prowadząca do aktywacji różnych proteaz, które uszkadzają komórki trzustki. Trypsyna produkowana w komórkach zrazikowych trzustki aktywuje receptor (PAR-2), który uwalnia cytokiny i reguluje wewnątrzwydzielnicze funkcje trzustki [12]. Działanie trypsyny, inhibitorów trypsyny oraz receptorów trypsyny są ze sobą mocno powiązane (Rys. 3).

1.2.3. Katepsyna G [EC 3.4.21.20]

Według klasyfikacji systemu MEROPS katepsyna G należy do klanu PA, podklanu PA(S), rodziny S1 [2, 3]. Gen katepsyny G umiejscowiony jest na

chromosomie 14 w miejscu q11.2 i zbudowany jest z 5 eksonów i intronów. Ekson 2 koduje aktywną histydynę, ekson 3 kwas asparaginianowy, a ekson 5 serynę.

Związki te tworzą triadę katalityczną Katepsyny G, która powoduje hydrolizę wiązań peptydowych dokładnie po mocno dodatnio naładowanych i aromatycznych resztach aminokwasowych w pozycji P1. Katepsyna G wykazuje specyficzność substratową trypsyno–podobną i chymotrypsyno–podobną. Jej aktywność możemy zaobserwować w szerokim zakresie stężenia jonów wodorowych (optymalne pH to wartości od 7 do 8). Proteazy te są bardzo ważne w utrzymaniu granicy pomiędzy zniszczeniem a ochroną tkanek podczas stanu zapalnego. Wpływają również na podstawowe funkcje neutrofili, takie jak proteolityczna dyfuzja cytokin i chemokin, działanie antibakteryjne, aktywacja receptorów na powierzchni komórek jak i apoptozę. Działanie antibakteryjne katepsyny G obejmuje zarówno mechanizmy zależne jak i niezależne od proteolizy. Enzym ten reguluje chemotaksję komórek krwi, poprzez wydzielenie silniejszego czynnika chemotaktycznego dla neutrofili i monocytów [13]. Chemotaksja jest to proces polegający na przyciąganiu w miejsce infekcji fagocytów, które pochłaniają patogen i go niszczą [14].

1.2.4. Trombina [EC 3.4.21.5]

Trombina podobnie jak chymotrypsyna należy do klanu PA, podklanu PA(S), rodziny S1 [2, 3].

Aktywna forma enzymu zbudowana jest z dwóch łańcuchów polipeptydowych: mniejszego A i większego B. Oba łańcuchy związane są ze sobą kowalencyjnym wiązaniem disiarczkowym [15].

Trombina odgrywa główną rolę w zachowaniu hemostazy organizmu oraz w procesach biologicznych takich jak np. różnicowanie komórek. Enzym ten aktywuje V, VIII, IX i XIII czynnik krzepnięcia krwi, katalizuje przemianę fibrynogenu w fibrynę oraz bierze udział w aktywacji wielu typów komórek i płytek krwi. Za sprawą specjalnych właściwości domen regulujących specyfikę enzymu, trombina jest bardzo specyficzna dla określonych substratów i inhibitorów [16].

Substratami trawionymi przez trombinę obok fibrynogenu są również receptory PAR (ang. *Protease-activated receptors*), czynniki krzepnięcia: V, VIII, XI, XIII, inhibitor fibrynolizy aktywowany trombiną (TAFI) i białko C [15].

Zakłócenia mechanizmów nadzorujących powstawanie oraz aktywność trombiny wpływają na tworzenie i rozwój licznych chorób układu krążenia (miażdżycy, żylna choroba zakrzepowo–zatorowa, choroba niedokrwienna serca, udar mózgu), nowotworowych, a także chorób neurodegeneracyjnych [15].

Choroby układu krążenia są główną przyczyną śmierci w krajach wysoko uprzemysłowionych, czy to pod postacią zawału serca, udaru mózgu, czy też

zakrzepicy żyłnej [2, 3]. W Polsce choroby te są przyczyną około 50 % zgonów [17].

1.2.5. Subtylizyna [EC 3.4.21.62]

Według systemu MEROPS subtylizyna należy do klanu SB, rodziny S8. Pierwotnie została ona odkryta u bakterii gram dodatnich *Bacillus subtilis*.

Jej katalityczna triada składająca się z kwasu asparaginowego, seryny i histydyny posiada dokładnie takie samo geometryczne ułożenie jak peptydazy z klanu PA. Jednak otaczający ją łańcuch białkowy ma inną budowę. Masa subtylizyny waha się od 18 do 90 kDa [18].

Subtylizyna znalazła szerokie zastosowanie np. przy produkcji detergentów. Czynniki, które umożliwiły stosowanie subtylizyny w tej dziedzinie są niska specyficzność substratowa, wysoka stabilność, łatwość w jej wyekstrahowaniu z biomasy oraz możliwość wyprodukowania dużej ilości enzymu w dość krótkim czasie przez bakterie *Bacillus subtilis* [19]. Badania nad subtylizyną doprowadziły do jej licznych modyfikacji. Poza tym stosowana jest w przemyśle kosmetycznym oraz w inżynierii białek [18].

1.2.6. Elastaza [EC 3.4.21.37]

Elastaza należy do klanu PA, podklanu PA(S), rodziny S1 [2, 3]. Po raz pierwszy została oczyszczona ze świńskiej trzustki w 1956 r., ale opisana została wcześniej, już w 1950 roku jako endopeptydaza, która trawi elastyny. Od tamtej pory enzym ten oczyszczono z komórek różnych gatunków ssaków [20]. Na szczególną uwagę zasługuje elastaza trzustkowa oraz elastaza neutrofilii.

Elastaza trzustkowa wytwarzana jest w komórkach zrazikowych trzustki w postaci prekursora. Aktywowana jest w dwunastnicy przez tripsynę, która powoduje rozszczepienie małego łańcucha polipeptydowego na N-końcu. Elastaza trzustkowa posiada zdolność bardzo szybkiego rozkładania elastyny, ponadto może również hydrolizować inne białka, np. fibrynę, hemoglobinę, kazeinę. Można wyróżnić dwa typy elastazy produkowanej przez trzustkę [20].

Elastaza neutrofilowa została wyizolowana z tkanek owczych. Produkowana jest w granulocytach obojętnochłonnych (neutrofilach), ale jej obecność w mniejszych ilościach stwierdzono również w komórkach tucznych i monocytach. Występuje w postaci izoform, które różnią się stopniem glikozylacji. Enzym ten posiada masę około 33kDa, a jego zawartość w komórkach granulocytów wynosi około 5 mM. Po aktywacji neutrofilii elastaza jest szybko wydzielana z komórki do przestrzeni pozakomórkowej. Pewna jej część pozostaje w neutrofilach, wiąże się z błoną cytoplazmatyczną. Aktywność enzymu regulowana jest przez liczne inhibitory endogenne [21].

1.2.7. Proteinaza K [EC 3.4.21.64]

Proteinaza K należy do klanu SB, rodziny S8 [2, 3]. Enzym ten został oczyszczony z *Tritirachium album*, który wykazuje zdolność do wzrostu w środowisku, gdzie jedynym źródłem azotu i węglowodanów jest keratyna. Cechę tę posiada dzięki enzymowi, który powoduje hydrolizę keratyny. Biorąc pod uwagę tę cechę enzym nazwano proteinazą K. Proteinaza K hydrolizuje natywne białka, które pochodzą z różnych źródeł, czego dowodem jest np. szybka inaktywacja rybosomów bydła [22].

Enzym zachowuje stabilność w szerokim zakresie pH (od 4 do 12), natomiast jej optymalne działanie zaobserwowano od 7,5 do 12 pH. Proteinaza K preferuje te wiązania peptydowe, które znajdują się obok grupy alifatycznej, karboksylowej i aromatycznej aminokwasów [22].

Proteinaza K może działać w obecności związków denaturujących takich jak SDS, mocznik, dzięki czemu znalazła zastosowanie w procesie izolacji kwasów nukleinowych, gdzie usuwa zanieczyszczenia białkowe [23].

2. Wybrane inhibitory proteaz serynowych

Proteazy serynowe działają według mechanizmów, które ściśle korelują z ich katalityczną naturą. Możemy zaliczyć tutaj wytwarzanie proteaz w postaci zymogenu. Jest to nieaktywna forma enzymu, która wymaga czynnika aktywującego, aby enzym stał się w pełni aktywny. Aktywacja polega na przecięciu zymogenu, usunięciu domeny pro np. Cat-C usuwa N-końcową prodomenę GzmA (granzymy A) i Gamb (granzymy B). Ponadto aktywność proteaz jest regulowana przez ich lokalizację. Niektóre z proteaz serynowych są przechowywane wewnątrz ziarnistości, które otoczone są proteoglikanami. Przeciwdziała to wyciekowi enzymu do cytoplazmy. Dodatkowo niskie pH w ziarnistościach powoduje obniżenie aktywności enzymów. Kolejną metodą regulacji aktywności proteaz serynowych jest wydzielanie przez organizm inhibitorów specyficznych [6].

Tabela 1. Przykłady wybranych inhibitorów proteaz serynowych pochodzenia bakteryjnego i grzybowego [4].

Inhibitory proteaz serynowych	Hamowane proteazy	Mechanizm działania i cechy strukturalne	Charakterystyka i występowanie
Owomukoid (Kazal-type)	Rodzina S1 (chymotrypsyny) i S8 (subtylizyny)	Ścisłe wiązanie, [Laskowski]	Opisane w <i>Stramenopiles oomycetes</i> (grzybopodobne organizmy, spokrewnione

			z grzybami; udział w patogenności <i>Phytophthora infestans</i>
Aprotynina	Rodzina S1 (chymotrypsyny)	Ścisłe wiązanie, [Laskowski]	Szeroka specyficzność hamowania proteaz z rodziny chymotrypsyny
Marinostatyna	Proteazy z rodziny S8 (subtylizyny) oraz niektóre proteazy rodziny S1 (chymotrypsyny).	Ścisłe wiązanie, Laskowski. Struktura stabilizowana jest przez dwa wewnętrzne wiązania estrowe, które są istotne dla ich aktywności hamującej	Wyłącznie dla bakterii morskich
Ekotylna	Rodzina S1 (chymotrypsyny)	Ścisłe wiązanie [Laskowski] do podstawowego miejsca wiązania. Aktywny jako dimer. Każdy monomer wiąże proteazy w dwóch miejscach wiązania	Ekotylna z <i>Enterobacteriae</i> i pasożytów ochrania przed proteazami trawinnymi gospodarza. Struktura umożliwia hamowanie wielu proteaz z rodziny chymotrypsyny
<i>Streptomyces subtilisin inhibitors</i> (SSI)	Rodzina S8 (subtylizyny, kexin), rodziny S1 (trypsyna, plazmina)	Ścisłe wiązanie, [Laskowski]	Wyłącznie dla bakterii <i>Actinomycetales</i> . Prawdopodobnie kontrolują endogenne proteazy zaangażowane w proteolityczną aktywację transglutaminazy
Inhibitory karboksypeptydazy Y	Serynowa karboksypeptydaza Y	Oprócz fosfolipidów w miejscu	Pierwszy przedstawiciel tej grupy został

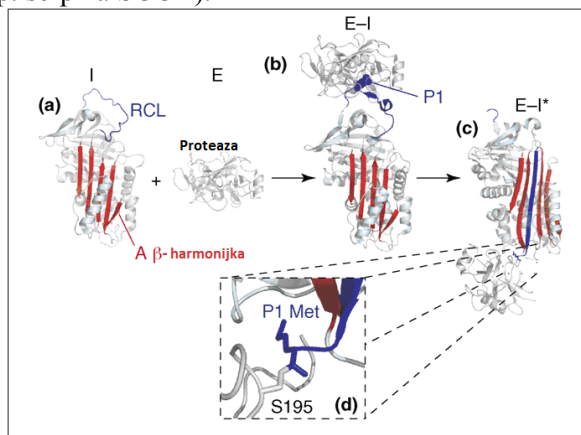
Proteazy serynowe i ich inhibitory jako nowoczesne narzędzia wykorzystywane w medycynie i biotechnologii

	(rodzina S10)	wiązania są dwa miejsca wiązania odpowiedzialne za hamowanie proteazy.	wyizolowany z drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> i należy do rodziny fosfatydyloetanolami no-wiążących białek.
Cnispin, cospin and Lentinus peptidase inhibitor	Silna inhibicja trypsyny, słaba inhibicja chymotrypsyny (rodzina S1)	Ścisłe wiązanie, [Laskowski]	Opisana tylko w grzybach <i>Basidiomycetes</i> . Wykazano obronną rolę przeciwko drapieżnym owadom.
Aspergillus elastase inhibitor	Ludzka elastaza-2 i endogenna <i>Aspergillus elastases</i> (rodzina S1)	Nieznany	Homologi zostały znalezione w kilku innych gatunkach Ascomycete i proteobacteria, ale żadne nie charakteryzowały się biochemicznie
Serpiny	Rodzina S1 (chymotrypsyny) i S8 (subtylizyny)	Inhibicja nieodwracalna w której następuje szybka konformacyjna zmiana pułapek pokrewnej proteiny w kompleks kowalencyjny.	Fizjologiczna rola serpin pochodzenia drobnoustrojowego to ochrona celulosomów przed proteolityczną degradacją.
Inhibitor peptydazy B	Rodzina S8 (subtylizyny)	Bakteryjne inhibitory są propeptydami ptoteaz subtylizyno-podobnych. Inhibitory grzybowe są oddzielnymi polipeptydami.	Są silnymi inhibitorami, ale niestabilnymi. Stopniowo degradowane przez subtylizynę.

Obok naturalnie występujących inhibitorów możemy wyróżnić inhibitory syntetyczne (np. dabigatran, argatroban, biwalirudyna), a wśród nich inhibitory diagnostyczne, np. PMSF (ang. phenylmethylsulfonyl fluoride).

2.1. Serpiny

Serpiny są największą grupą białkowych inhibitorów proteaz serynowych oraz jednocześnie najczęściej występującą u organizmów żywych. W jej skład wchodzi ponad 500 białek. Największą ilość serpin odkryto u człowieka, ale również u innych ssaków, u stawonogów, nicieni i roślin. Biorą one udział w najważniejszych procesach życiowych organizmów żywych. Większość z nich (około 90%) hamuje aktywność proteaz serynowych o aktywności chymotrypsyno-podobnej. Jednak niektóre zdolne są do inhibicji np. proteaz cysteinowych (np. serpina SCCA).



Rys.3. Mechanizm hamowania aktywności proteaz serynowych przez serpiny. (a) Natywny inhibitor trypsyny (I) zawiera trzy B-harmonijki i 9 alfa-helis. Największa harmonijka (A) zaznaczona jest na kolor czerwony. RLC (reactive centre loop – reaktywny środek pętli) zaznaczony jest na niebiesko na szczycie cząsteczki. (b) po interakcji z proteazą (E – kolor różowy) tworzy się kompleks początkowy Michaelisa (E-I). Za specyficzność odpowiedzialne są przede wszystkim reszty, reszta P1 przedstawiona jest na niebiesko. (c) rozszczepienie RCL powoduje połączenie tego regionu w region centralny, czwarty skręt (na niebiesko) z A B-harmonijką (E-I*). (d) struktura kompleksu enzymatycznego ukazała wiązanie kowalencyjne pomiędzy miejscem aktywnym seryny i tlenem karboksylowym w reszcie P1. Opracowano w oparciu o Whisstock, Bottomley, 2006 [24]

Typowe serpiny są stosunkowo duże. Ich masa to około 40–60 kDa. Większość spośród nich jest związkami zewnątrzkomórkowymi – krążącymi w płynach ustrojowych.

2.1.1. Euroserpiny

Neuroerpiny wchodzi w skład nadrodziny inhibitorów proteaz serynowych – serpin. Ludzki gen kodujący tego rodzaju inhibitory zlokalizowany jest w regionie

3q26. Wydzielane są ze stożków wzrostu neuronów. Uczestniczą w hamowaniu aktywności enzymów tkankowych tPA (typ aktywatora plazminogenu). Ich przestrzenna struktura wskazuje na rolę w synaptogenezie (tworzenie synaps między neuronami) i jest bardzo dobrze widoczna w obszarach mózgu odpowiedzialnych za takie procesy jak nauka, zapamiętywanie i zachowanie. Chronią neurony przed nadmierną aktywnością tPA podczas stanów patologicznych, takich jak niedokrwienie mózgu, padaczka. Ekspresja neuroserpin zlokalizowana jest głównie w mózgu, ale można ją zaobserwować również w mięśniu sercowym, nerkach, trzustce. Mutacja punktowa w genie kodującym neuroserpiny powoduje powstawanie demencji [25].

Mechanizm działania serpin w inhibicji proteaz serynowych (tzw. „pułapka na myszy”) pomimo skuteczności w działaniu posiada słabe punkty. Wystąpienie mutacji punktowej może wywołać destabilizację struktury, w wyniku czego powstaje luka, która może zostać wypełniona przez reaktywną pętlę drugiej cząsteczki serpiny. W wyniku tego dochodzi do polimeryzacji cząsteczek serpin (neuroserpin), które są przyczyną takich chorób jak demencja starcza. Proces ten występuje również u innych inhibitorów z grupy serpin, np. u alfa-1-antytrypsyny, inhibitora C1. U ludzi zostały opisane 4 różne mutacje neuroserpin (Ser49Pro, Ser52Arg, His338Arg and Gly392Glu). We wszystkich następuje spontaniczne powstawanie polimerów neuroserpin, które nie są usuwane, lecz wbudowywane do głębszych warstw kory mózgu. Ta autosomalna dominacja została określona jako FENIB (ang. Familial Encephalopathy with Neuroserpin Inclusion Bodies). FENIB charakteryzuje się występowaniem zaburzeń mowy, demencji, drgawkami, drżeniami, skurczami klonicznymi mięśni. Objawy te występują w różnym nasileniu.

2.2. Alfa-1-antytrypsyna

Alfa-1-antytrypsyna (alfa-1AT) jest glikozylowaną antypeptydazą o masie około 52kDa produkowaną głównie w wątrobie. Zbudowana jest z pojedynczego łańcucha, w skład którego wchodzi 394 reszty aminokwasowe oraz trzy podstawniki cukrowe. Struktura przestrzenna oparta jest na trzech beta-pofałdowaniach (A-C) i dziewięciu alfa-helisach (A-I). Centrum aktywne zawiera sekwencję aminokwasową Met358-Ser359, zwaną również sekwencją P1-P1'. Sekwencja ta jest pseudosubstratem dla elastazy neutrofilowej, która preferuje alfa-1-antytrypsynę a nie swój naturalny substrat – elastynę [26].

Gen alfa-1-antytrypsyny zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 14. Służy jako główny inhibitor elastazy neutrofilowej. Wydzielana jest przez komórki wątrobowe (hepatocyty) do osocza, skąd dalej dyfunduje do poszczególnych narządów organizmu. Komórki nabłonkowe, neutrofile oraz makrofagi także produkują i wydzielają alfa-1-antytrypsynę, której aktywność jest taka sama jak alfa-1-antytrypsyny pochodzącej z hepatocytów. Służy to do lokalnej kontroli aktywności proteazy. Nadmierna

aktywność tej proteazy może powodować degradację zewnątrzkomórkowych białek, prowadząca np. do rozedmy płuc [27].

Wyróżniono trzy główne warianty alfa-1-antytrypsyny:

- Warianty podstawowe – w tym główny wariant M, odpowiadają genotypom homozygotycznym MM. Występują u około 90% populacji ludzkiej. Stężenie tego związku w surowicy wynosi od 20 do 48 $\mu\text{mol/l}$. Inhibicja elastazy neutrofilowej przebiega właściwie,
- Warianty niedoborowe – w tym główne warianty S i Z, odpowiadają genotypom homozygotycznym SS i ZZ. Fenotypowo przejawiają się jako PiS oraz PiZ. Ich występowanie w populacji wynosi dla PiS od 2 do 4 %, PiZ – od 1–2%. Stężenie waha się odpowiednio 13 do 33 $\mu\text{mol/l}$ oraz od 2,5 do 7 $\mu\text{mol/l}$. Inhibicja elastazy neutrofilowej przebiega prawidłowo przy fenotypie PiS, zaburzona jest natomiast przy fenotypie PiZ,
- Warianty „null” – synteza alfa-1-antytrypsyny nie odbywa się lub tworzone jest białko ulegające szybkiej degradacji. Spowodowane jest to wystąpieniem mutacji powodującej powstanie kodonu stop. W takiej sytuacji związek nie występuje w surowicy. Częstość występowania tego przypadku w populacji ludzkiej wynosi około 1 % [26].

3. Przykłady zastosowań proteaz serynowych i ich inhibitorów w medycynie i farmacji

Proteazy serynowe pełnią kluczową rolę w wielu procesach biologicznych. Są ważne w przyswajaniu składników pokarmowych koniecznych do prawidłowego wzrostu i proliferacji komórek. Hydroliza białek stanowi ważny etap w metabolizmie azotu. Enzymy te są zaangażowane w procesach metabolicznych, w tym replikacji DNA, regulacji ekspresji genów, wzrost i różnicowanie komórek, transportu białek, cykl komórkowy, reakcji szoku cieplnego, stres oksydacyjny, odpowiedź i programowanej śmierci komórki i wiele innych [4].

Niekontrolowana aktywność proteaz prowadzi do powstawania wielu stanów patologicznych. Dzięki korelacjom proteaz z inhibitorami, negatywne działanie enzymów jest hamowane. Nie powinno więc dziwić wzmożone zainteresowanie badaczy tego typu białkami i ich naturalnymi inhibitorami jako potencjalnymi substancjami stosowanymi np. w farmakologii [4].

3.1. Zastosowanie enzymów trzustkowych – trypsyny, chymotrypsyny, elastazy – w biotechnologii i przemyśle spożywczym

Enzymy trzustkowe znalazły zastosowanie zarówno w przemyśle spożywczym, jak i w ośrodkach badawczych, takich jak laboratoria. Używane są jako oczyszczone preparaty elastaz, chymotrypsyn, trypsyn. Obok tych form enzymy te są stosowane pod postacią produktu o nazwie pankreatyna. Pankreatyna jest to suchy związek, wyodrębniony z trzustki, w skład którego wchodzi takie enzymy jak np. trypsyna, amylaza i lipaza. Ułatwiają one

trawienie cukrów, białek i tłuszczów w obrębie układu pokarmowego. Pankreatyna znalazła zastosowanie przy nieżytach jelit, zaburzeniach trawiennych, przewlekłym zapaleniu trzustki [10].

Głównym zastosowaniem enzymów trawiennych w biotechnologii jest wytwarzanie hydrolizatów białkowych, np. z albuminy jaja, z hemoglobiny oraz hydrolizatów kazeinowych czy sojowych. Hydrolizaty kazeinowe znalazły zastosowanie jako dodatek do żywności dietetycznej. Enzymy trzustkowe używane są też do odmięśniania kości wieprzowych oraz szkieletów ryb.

Białka ulegające hydrolizie pod wpływem enzymów trzustkowych nabywają nowych charakterystycznych cech. Wykazują właściwości antybakteryjne oraz antyoksydacyjne. Niektóre peptydy są lepiej przyswajalne, a ich częściowa hydroliza pozwala na obniżenie właściwości immunogennych. Hydroliza wpływa też na właściwości technologiczne preparatu białkowego, przyczyniając się do zmiany rozpuszczalności, właściwości emulgujących oraz zwiększa zdolność tworzenia piany.

Najczęściej stosowane do tych celów są enzymy pochodzenia bydlęcego i wieprzowego. Jednak wzrost zapotrzebowania na ten typ enzymów skłonił badaczy do szukania innych źródeł ich otrzymania. Enzymy te zostały wyekstrahowane również z organów ryb oraz z tkanek owczych. Proteazy trawienne z poszczególnych organizmów różnią się nieznacznie pod względem właściwości fizykochemicznych oraz specyficzności substratowej. Dzięki tym różnicom enzymy te mogą być wykorzystywane do otrzymania zróżnicowanych produktów poprzez hydrolizę białkowych substratów [10].

3.2. Zastosowanie alfa-1-antytrypsyny w terapii medycznej

Niedobór alfa-1-antytrypsyny powoduje powstawanie takich schorzeń jak rozedma płuc oraz marskość wątroby.

Przebieg powstawania rozedmy płuc jest następujący. Podczas oddychania, wraz z pobieranym powietrzem, do płuc przedostają się drobnoustroje. Są one niszczone przez neutrofile (granulocyty obojętnochłonne). Po wykonaniu swojego zadania neutrofile ulegają degradacji, w wyniku czego do płuc (a dokładnie do zrębu płuc) wydzielane są proteazy (w dużej mierze elastaza neutrofilowa). U ludzi zdrowych, z prawidłowo działającą alfa-1-antytrypsyną, degradacyjne działanie elastazy jest hamowane. Przy niedoborze lub dysfunkcji alfa-1-antytrypsyny elastaza powoduje rozkład włókien elastylowych, co prowadzi do rozedmy płuc.

Powstawanie marskości wątroby spowodowane jest m.in. mutacją w eksonie V genu alfa-1-antytrypsyny. Prowadzi to do nieprawidłowości w trzeciorzędowej strukturze białka oraz do zakłóceń w wewnątrzcząsteczkowych cząsteczkowych wiązaniach jonowych. Tak zmieniona alfa-1-antytrypsyna cechuje się zdolnością do polimeryzacji w warunkach fizjologicznych. Powstałe polimery kumulują się w kanałach siateczki śródplazmatycznej komórek wątrobowych (hepatocytów). Powoduje to ich obumieranie. Efektem tego może być zapalenie, marskość a nawet nowotwór wątroby [26].

Tabela 3. Zaburzenia wydzielania i budowy cząsteczki poszczególnych inhibitorów proteaz serynowych i wywołwane przez nie schorzenia. Opracowano na podstawie Kabziński i in., 2010 [26].

Inhibitor proteazy serynowe	Rodzaj dysfunkcji	Schorzenie
Alfa-1-antytrypsyna	Niedobór	Rozedma płuc
Alfa-1-antytrypsyna	Polimeryzacja	Marskość
Neuroserpina	Polimeryzacja	Demencja
Inhibitor C1	Niedobór	Angio-edemia
Antytrombina	Niedobór	Zakrzepica
Alfa-1-antytrypsyna	Niedobór	Rozedma płuc

Głównym sposobem leczenia tych schorzeń jest stosowanie terapii zastępczej, polegającej na podawaniu chorym egzogennej alfa-1-antytrypsyny. Podstawową metodą pozyskiwania tego białka jest frakcjonowanie go z bezpośrednich źródeł, takich jak np. osocze. Niesie to jednak duże ryzyko zakażenia różnymi patogenami poprzez kontakt z materiałami krwiopochodnymi. Ze względu na ten aspekt postanowiono uzyskać zrekombinowaną alfa-1-antytrypsynę z innych organizmów, która w bezpieczny sposób może zostać podana osobom chorym.

Pierwszymi organizmami, z których udało się pozyskać alfa-1-antytrypsynę były modyfikowane genetycznie szczepy *Escherichia coli*. Gen cDNA posiadający całkowitą sekwencję ludzkiej alfa-1-antytrypsyny został wprowadzony metodą transformacji do komórek *E. coli*. Jednak alfa-1-antytrypsyna uzyskana tymi metodami nie ulega potranslacyjnej glikozylacji, niezbędnej do uzyskania cech fizjologicznych białka. Kolejnymi organizmami z których udało się uzyskać alfa-1-antytrypsynę były zwierzęta transgeniczne. Pierwsze badania przeprowadzono na myszach. Aktywność otrzymanej alfa-1AT zbliżona była do aktywności alfa-1AT wyizolowanej z ludzkiego osocza. Dalsze badania przeprowadzono na królikach, gdzie zrekombinowany konstrukt DNA, w skład którego wchodził gen ludzkiej alfa-1AT, wprowadzono do jąder komórkowych króliczych embrionów. Obecnie trwają badania nad uzyskaniem zrekombinowanej alfa-1-antytrypsyny przy wykorzystaniu modyfikowanych organów owczych. Metoda ta jest wydajna dzięki możliwości wytworzenia tego białka w mleku i wiąże się to z jego produkcją na skalę przemysłową. Wydajność pozyskanej z mleka jednej owcy w okresie laktacji alfa-1-antytrypsyny wynosić może nawet 10 kg w ciągu roku. Badania koncentrują się również nad uzyskaniem alfa-1-antytrypsyny z organizmów roślinnych.

Dzięki zastosowaniu zrekombinowanej alfa-1-antytrypsyny, uzyskanej wyżej opisanymi metodami, można leczyć takie choroby jak rozedmę płuc czy marskość wątroby bez ryzyka zakażenia pacjenta patogenami [26].

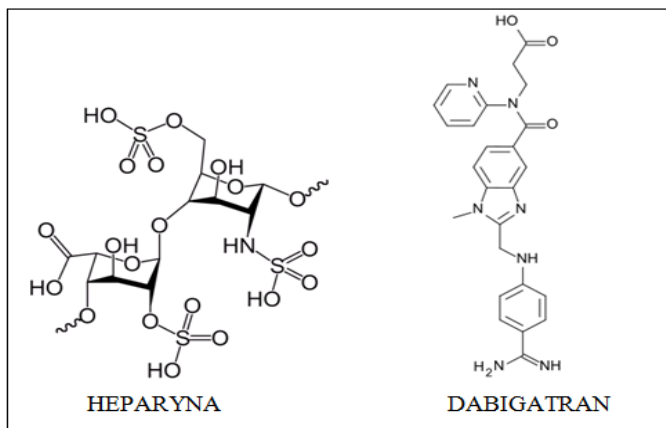
3.3. Zastosowanie inhibitorów trombiny w terapiach przeciwzakrzepowych

Trombina jest enzymem proteolitycznym odpowiedzialnym za takie procesy jak aktywację czynników krzepnięcia krwi, płytek krwi oraz za przemianę rozpuszczalnego fibrynogenu w nierozpuszczalną fibrynę. Dlatego zaburzenia procesów regulujących aktywację trombiny oraz jej aktywność prowadzą do powstania licznych chorób, takich jak choroby układu krążenia, nowotwory oraz choroby neurodegeneracyjne. Z tego względu oraz dlatego, iż trombina odgrywa centralną funkcję w kaskadzie krzepnięcia krwi stała się idealnym celem dla terapii antyzakrzepowych [15].

Związkami używanymi w tego typu terapii są m.in. inhibitory trombiny. Można podzielić je na dwie grupy:

- Inhibitory o działaniu pośrednim

Mechanizm działania tych związków polega na zwiększeniu przez nie aktywności inhibitorów naturalnie występujących, np. antytrombiny III, kofaktora heparyny II. Inhibitory z tej grupy mogą hamować jedynie wolną trombinę. Do tej grupy możemy zaliczyć heparynę. Heparyna (Rys.14.) należy do naturalnych inhibitorów trombiny. Była pierwszym na świecie lekiem o właściwościach przeciwzakrzepowych. Pierwszy raz została wyizolowana z wątroby psa. Już wtedy stwierdzono jej działanie antykoagulacyjne. Współcześnie w farmakologii używane są dwa typy heparyn. Heparyna niefrakcjonowana oraz heparyna drobnocząsteczkowa. Stosowanie niefrakcjonowanej heparyny może doprowadzić do licznych powikłań. Głównym z nich jest nadmierne krwawienie. Może również wystąpić trombocytopenia poheparynowa, zwana również małopłytkowością poheparynową (ang. heparin induced thrombocytopenia, HIT). Jest to choroba objawiająca się małą liczbą płytek krwi spowodowana podawaniem heparyny pod różną postacią (zarówno frakcjonowaną jak i drobnocząsteczkową). Schorzenie to spowodowane jest tworzeniem swoistych IgG (immunoglobulin klasy G) przeciwko epitopom (fragmenty antygenów łączących się z wolnymi przeciwciałami), powstałym przez związanie czynnika płytkowego 4 (PF4) z trombiną. Konsekwencją tego jest aktywacja płytek przez powstały kompleks, a następnie spadek ilości płytek krwi – trombocytów poniżej $100 \times 10^9/L$. Kolejnym powikłaniem może być osteoporoza, która powstaje przy dłuższym stosowaniu heparyny niefrakcjonowanej. Działanie heparyny drobnocząsteczkowej jest łatwiejsze do przewidzenia (dzięki zmniejszonemu wiązaniu tej heparyny przez białka osocza). Słabiej oddziałuje z trombocytami oraz czynnikiem płytkowym 4, dzięki czemu zmniejsza się ryzyko powstania trombocytopenii (lecz nie eliminuje go całkowicie). Dzięki tym właściwościom heparyna drobnocząsteczkowa wypiera heparynę niefrakcjonowaną z lecznictwa.



Rys.4. Wzory strukturalne wybranych inhibitorów trypsyny [28][15].

Mechanizm oddziaływania heparyny z trombiną polega na utworzeniu z antytrombiną kowalencyjnego kompleksu ATH (antytrrombina–heparyna), który powoduje zmianę konformacji antytrombiny (ATIII), a tym samym zwiększa jej powinowactwo do trombiny. ATIII z wolno działającego inhibitora przekształca się w inhibitor bardzo szybko działający.

Warto dodać, że heparyna była pierwszym na świecie stosowanym lekiem przeciwzakrzepowym.

- Inhibitory o działaniu bezpośrednim

Inhibitory hamują aktywność trombiny poprzez bezpośrednie łączenie się z cząsteczką trombiny. Inhibitory te łączą się zarówno z trombiną związaną z fibryną oraz z trombiną w stanie wolnym. Możemy zaliczyć tutaj hirudynę, biwalirudynę, argatroban oraz ximelagatran i dabigatran (dwa ostatnie związki stanowią nową klasę syntetycznych inhibitorów, które podawane są doustnie).

Hirudyna jest polipeptydem wyekstrahowanym z gruczołów ślinowych pijawek *Hirudo medicinalis* zawierającym 65 aminokwasów. Cząsteczka hirudyny stabilizowana jest przy pomocy trzech mostków disiarczkowych, posiada masę około 7 kDa. Mechanizm jej działania polega na utworzeniu z trombiną niekowalencyjnego kompleksu w stosunku 1:1. C–koniec hirudyny przyłącza się do miejsca zewnętrznego I trombiny, natomiast N–koniec łączy się z centrum aktywnym trombiny.

Zarówno hirudyna jak i heparyna stosowane są w sposób parenteralny (dostarczenie związków do organizmów poza przewodem pokarmowym).

Dabigatran (Rys.14) w odróżnieniu od hirudyny i heparyny jest syntetycznym inhibitorem trombiny. Ma zdolność łączenia się z centrum aktywnym trombiny (naśladuje strukturę tripeptydu D–Phe–Pro–Arg, która charakterystyczna jest dla substratów trombiny). Podawany jest doustnie w postaci proleku, którego masa wynosi 628 Da (masa aktywnego leku wynosi 471 Da). Zaletą stosowania tego związku przy terapii przeciwzakrzepowej jest

to, iż nie wchodzi on w interakcje z innymi lekami, działa szybko oraz obniża ilość powikłań krwotocznych. Podwyższa również bezpieczeństwo terapii przepiwnzakrzepowych oraz ich komfort ich stosowania dzięki możliwości korzystania z dabigatranu bez ciągłego monitorowania parametrów krzepnięcia krwi oraz dostosowania wielkości dawki do pacjenta [15].

3.4. Antygen specyficzny dla prostaty jako marker nowotworu gruczołu krokowego

Markerami nowotworowymi określa się wysokocząsteczkowe związki występujące w moczu, krwi lub połączone z powierzchnią komórek nowotworowych charakterystyczne dla tych komórek. Pomiar poziomu oraz identyfikacja tych związków pomocne są w określeniu, czy dany nowotwór występuje u badanego pacjenta, czy nie oraz pozwala na planowanie i monitorowanie terapii do antynowotworowej.

Nowotworem nazywa się niewłaściwy i zbyt duży rozrost tkanek, który nie jest zsynchronizowany z rozrostem innych, prawidłowo funkcjonujących tkanek oraz nie odpowiadają na mechanizmy regulacyjne organizmu. Problemem powstawania dużej liczby nowotworów jest labilność genomu komórek odpowiedzialnych za inicjację wzrostu guza.

Testy wykrywające nowotwory, których podstawą jest ocena poziomu specyficznych markerów powinny wykazywać następujące cechy:

- ilość wykrywanego markera musi odzwierciedlać stadium choroby oraz odpowiedź organizmu na zastosowane leczenie,
- określony marker musi być sprzężony z rozwojem określonego typu nowotworu,
- pozytywny wynik testu musi występować tylko u chorych osób.

Antygen specyficzny dla prostaty – PSA (ang. Prostate-specific antigen) zwany również swoistym antygenem sterczowym jest enzymem należącym do proteaz serynowych [29]. Produkowany jest przede wszystkim w komórkach nabłonkowych kanałów gruczołowych prostaty. Po wydzieleniu do kanałów przedostaje się do płynu nasiennego, gdzie spełnia funkcje przy degradacji białek. PSA wykazuje swoistość narządową w odniesieniu do tkanki gruczołu. Nie jest jednak markerem charakterystycznym dla nowotworu prostaty, gdyż jego ilość wzrasta kiedy wystąpi gruczolak lub stana zapalny stercza.

PSA w surowicy krwi występuje w dwóch frakcjach: frakcja wolnego PSA – fPSA, ang. free prostate specific antigen (PSA nie związane) oraz frakcja PSA związanej z inhibitorem proteazy (np. alfa-1-antychymotrypsyną) [30].

U zdrowych mężczyzn poziom PSA nie wybiega poza 3 ng/ml, jednak rośnie u tych, u których występuje łagodny przerost bądź nowotwór prostaty. 10ng/ml jest wartością, która charakteryzuje łagodny przerost gruczołu krokowego. Znaczące przekroczenie tej wartości może wskazywać na raka stercza. Te wartości nie są jednak w pełni obiektywne i nie wskazują jednoznacznie na

wystąpienie nowotworu, dlatego nie można w pełni się nimi sugerować [29]. Z tego powodu do oceny ilości PSA, wskazującego na rozwój raka prostaty, wprowadzono oznaczenia stężenia wolnego PSA –fPSA (ang. free prostate specific antigen) oraz ilorazu stężeń fPSA i PSA całkowitego. W praktyce wygląda to następująco:

- poziom PSA wynoszących 4,0–20,0 ng/ml fPSA poniżej 18% – duże prawdopodobieństwo wystąpienia raka stercza,
- poziom PSA 4–20ng/ml i fPSA powyżej 25% – wyniki wskazujące za wystąpieniem gruczolaka.

Kolejnymi metodami usprawniającymi diagnostykę nowotworu są:

- ocena szybkości narastania PSA (w tym celu wykonuje się trzy pomiary w odstępach sześciomiesięcznych),
- wyliczanie gęstości PSA (iloraz stężenia markera do objętości gruczołu w cm³),
- stężenie całkowitego PSA w zależności od wieku pacjenta (Tab.4.) [30].

Tabela 4. Prawidłowe stężenie całkowitego PSA w zależności od wieku [30].

Wiek	Stężenie PSA [ng/ml]
40–49	2,5
50–59	3,5
60–69	4,5
70–79	6,5

3.5. Zastosowanie inhibitorów trypsyny pochodzenia roślinnego

Inhibitory trypsyny to białka (zwykle pojedyncze) o masie od 4 do 20 kDa, występujące w postaci izomerów. Związki te nie są charakterystyczne jedynie dla trypsyny (nie są swoiste). Mogą hamować aktywność innych proteaz, które posiadają serynę w miejscu aktywnym. Mechanizm hamowania aktywności trypsyny polega na powstawaniu nieaktywnych kompleksów z enzymami trawiennymi. Powstawanie kompleksu opiera się na tworzeniu wiązań estrowych pomiędzy seryną (z centrum aktywnego enzymu) a lizyną bądź arginina (z centrum aktywnego inhibitora).

Inhibitory protez serynowych (w tym trypsyny) powstają głównie w roślinach (nasiona roślin strączkowych, pasze – części zielone zbóż i roślin motylkowych, ziarna zbóż). Pełnią one funkcje ochronne zabezpieczające roślinę przed infekcjami bakteryjnymi i wirusowymi oraz obronne, poprzez hamowanie enzymów trawiennych zwierząt, głównie owadów. Inhibitory trypsyny są też substancjami antyżywniowymi [31].

Substancje antyżywniowe są to związki występujące w roślinach, które mogą powodować zahamowanie wzrostu zwierzęcia. Możemy podzielić je na substancje antyżywniowe pierwotne oraz wtórne. Do pierwszej grupy obok inhibitorów

trypsyny możemy zaliczyć również substancje węglowodanowe – polisacharydy niestrawne, substancje tłuszczowe – kwas erukowy. Z wyjątkiem inhibitorów trypsyny pełnią one funkcje podporowe (funkcję tę spełniają związki o budowie kleistej i włóknistej, które określają kształt i formę rośliny dzięki czemu jest ona odporna na czynniki otoczenia). Drugą grupą są substancje antyżywnieniowe wtórne, takie jak związki fenolowe, alkaloidy, glukozynolany. Pełnią one rolę ochronną przed bakteriami, grzybami, zwierzętami oraz wirusami [32].

Substancje antyżywnieniowe mogą wykazywać działanie zarówno pozytywne jak i negatywne u spożywających je z paszą organizmów. Ujemny wpływ inhibitorów trypsyny polega na zahamowaniu wzrostu zwierząt hodowlanych lub człowieka (spowodowane jest to blokowaniem trypsyny, co z kolei powoduje zahamowanie reakcji zachodzących przy udziale tego enzymu oraz zmniejszenia proteolitycznego rozkładu białek w przewodzie pokarmowym). Może również spowodować spadek odporności u owadów [31]. Sposobem na zmniejszenie aktywności inhibitorów trypsyny jest tostowanie (podgrzewanie) pożywienia pochodzenia roślinnego. Prawidłowo przeprowadzony proces tostowania obniża nawet sześciokrotnie aktywność inhibitorów trypsyny bez utraty wartości pokarmowej [32].

Pozytywne działanie inhibitorów trypsyny można zauważyć w przypadku dietoterapii, gdzie podawany jest pokarm bogaty w te inhibitory. U leczonych zwierząt tego typu terapią zaobserwowano zahamowanie wzrostu i rozwoju raka sutka, skóry oraz nowotworu jelita grubego. Zaobserwowano również hamujący wpływ inhibitorów trypsyny na powstawanie nowotwory wątroby, płuc oraz trzustki. Przeciwnowotworowe działanie polega na inhibicji ekspresji onkogenów, hamowaniu powstawania reaktywnych form tlenu oraz modulacji aktywności niektórych enzymów. Inhibitory trypsyny stymulują żółć do syntezy kwasów żółciowych z cholesterolu. Jest to pomocne przy usuwaniu cholesterolu z organizmu, dzięki czemu zmniejsza się ryzyko powstania miażdżycy, chorób układu krążenia (udar mózgu, choroba wieńcowa) oraz kamieni żółciowych (cholesterol jest ich głównym składnikiem). Obiecującym i dającym dobre efekty zastosowaniem inhibitorów trypsyny jest użycie ich przy leczeniu AIDS, gdzie hamują odwrotną transkryptazę wirusa HIV i tłumią jego replikację oraz leukoplakii (białe plamy powstające we wnętrzu jamy ustnej. Jest to zmiana przednowotworowa) [31].

4. Podsumowanie

Peptydazy serynowe oraz ich inhibitory znalazły wiele zastosowań w medycynie i biotechnologii. Możemy wymienić następujące przykłady zastosowań np. w przemyśle spożywczym, w terapiach antyzakrzepowych, zapobieganie chorobom jak rozedmie płuc oraz marskości wątroby, jako markery przy nowotworze prostaty czy w przeciwdziałaniu nowotworom. Z racji na swoją różnorodność zarówno pod względem budowy jak i specyficzności

substratowej, termo-stabilności, zakresu pH i tp. stanowią one również niezwykle atrakcyjny materiał dla dalszych badań w wymienionych kierunkach.

Literatura

1. A. Sumantha, C. Larroche, i A. Pandey, „Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective”, *Food Technol. Biotechnol.*, t. 44, nr 2, s. 211, 2006.
2. „<http://merops.sanger.ac.uk/>”.
3. N. D. Rawlings, A. J. Barrett, i A. Bateman, „MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors”, *Nucleic Acids Res.*, t. 40, nr Database issue, s. D343–350, sty. 2012.
4. J. Sabotič i J. Kos, „Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, t. 93, nr 4, s. 1351–1375, luty 2012.
5. Cecília M. Antão i F. X. Malcata, „Plant serine proteases: biochemical, physiological and molecular features”, *Plant Physiol. Biochem.*, t. 43, nr 7, s. 637–650, 2005.
6. K. M. Heutinck, I. J. M. ten Berge, C. E. Hack, J. Hamann, i A. T. Rowshani, „Serine proteases of the human immune system in health and disease”, *Mol. Immunol.*, t. 47, nr 11–12, s. 1943–1955, Lipiec 2010.
7. L. Hedstrom, „Serine protease mechanism and specificity”, *Chem. Rev.*, t. 102, nr 12, s. 4501–4524, 2002.
8. F. Yang, W.–J. Su, B.–J. Lu, T. Wu, L.–C. Sun, K. Hara, i M.–J. Cao, „Purification and characterization of chymotrypsins from the hepatopancreas of crucian carp (*Carassius auratus*)”, *Food Chem.*, t. 116, nr 4, s. 860–866, Październik 2009.
9. F. J. Castillo–Yañez, R. Pacheco–Aguilar, M. E. Lugo–Sanchez, G. Garcia–Sanchez, i I. E. Quintero–Reyes, „Biochemical characterization of an isoform of chymotrypsin from the viscera of Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*), and comparison with bovine chymotrypsin”, *Food Chem.*, t. 112, nr 3, s. 634–639, Luty 2009.
10. M. Żelazko, J. Chrzanowska, i A. Polanowski, „Proteiny trzustkowe—różnicowanie międzygatunkowe i wynikające z tego implikacje żywieniowe i biotechnologiczne”, *Biotechnologia*, t. 76, nr 1, s. 107–120, 2007.
11. G. Kanno, T. Yamaguchi, H. Kishimura, E. Yamaha, i H. Saeki, „Purification and characteristics of trypsin from masu salmon (*Oncorhynchus masou*) cultured in fresh–water”, *Fish Physiol. Biochem.*, t. 36, nr 3, s. 637–645, wrz. 2010.
12. M. Hirota, M. Ohmuraya, i H. Baba, „The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis”, *J. Gastroenterol.*, t. 41, nr 9, s. 832–836, wrz. 2006.
13. T. Burster, H. Macmillan, T. Hou, B. O. Boehm, i E. D. Mellins, „Cathepsin G: roles in antigen presentation and beyond”, *Mol. Immunol.*, t. 47, nr 4, s. 658–665, 2010.
14. Kandefer–Szerszeń, Martyna, Paduch, Roman, Zdzisińska, Barbara, Szuster – Ciesielska, Agnieszka, Rzeski, Wojciech, i Kamińska, Teresa, *Ćwiczenia z immunologii*. Lublin: Wydawnictwo UMCS, 2006.
15. Bijak Michał i Bobrowski Mateusz, „Znaczenie inhibitorów trombiny w farmakoterapii przeciwzakrzepowej”, *Borgis – Postępy Nauk Med.*, nr 10, s. 819–825, 2010.

16. R. D. Cristofaro i E. D. Candia, „Thrombin Domains: Structure, Function and Interaction with Platelet Receptors”, *J. Thromb. Thrombolysis*, t. 15, nr 3, s. 151–163, cze. 2003.
17. „<http://www.ptkardio.pl>”.
18. M. J. Page i E. D. Cera, „Serine peptidases: Classification, structure and function”, *Cell. Mol. Life Sci.*, t. 65, nr 7–8, ss. 1220–1236, kwi. 2008.
19. K.–H. Maurer, „Detergent proteases”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, t. 15, nr 4, s. 330–334, Sierpień 2004.
20. L. S. Erlandsson i H. Filippsson, „Purification and characterization of ovine pancreatic elastase”, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, t. 120, nr 3, s. 549–557, Lipiec 1998.
21. K. Kawabata, T. Hagio, i S. Matsuoka, „The role of neutrophil elastase in acute lung injury”, *Eur. J. Pharmacol.*, t. 451, nr 1, s. 1–10, Wrzesień 2002.
22. W. Ebeling, N. Hennrich, M. Klockow, H. Metz, H. D. Orth, i H. Lang, „Proteinase K from *Tritirachium album Limber*”, *Eur. J. Biochem.*, t. 47, nr 1, s. 91–97, 1974.
23. H. Hilz, U. Wieggers, i P. Adamietz, „Stimulation of Proteinase K Action by Denaturing Agents: Application to the Isolation of Nucleic Acids and the Degradation of ‘Masked’ Proteins”, *Eur. J. Biochem.*, t. 56, nr 1, s. 103–108, 1975.
24. J. C. Whisstock i S. P. Bottomley, „Molecular gymnastics: serpin structure, folding and misfolding”, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, t. 16, nr 6, s. 761–768, Grudzień 2006.
25. E. Miranda i D. A. Lomas, „Neuroserpin: a serpin to think about”, *Cell. Mol. Life Sci. Cmls*, t. 63, nr 6, s. 709–722, mar. 2006.
26. J. Kabziński, J. Kłedziara, i I. Majsterek, „Zastosowania rekombinowanej alfa-1 antytrypsyny w terapii medycznej”, *Pol Merk Lek*, t. 174, s. 345–350, 2010.
27. Mulgrew, A.T., Taggart, C., i McElvaney, N. G., „Local production of alpha 1-antitrypsin in the lung”, *Natl. Sci. Med. Meet.*, s. 91–92, kwi. 2001.
28. „<http://brain.fuw.edu.pl>”.
29. R. Paduch i J. Klatka, „Markery nowotworowe”, *Onkol. Pol.*, nr 6, s. 77–82, 2003.
30. A. Soborczyk i A. Deptała, „Markery nowotworowe w praktyce klinicznej”, *Chor. Serca Naczyń*, t. 4, nr 4, s. 184–189, 2007.
31. A. Winiarska-Mieczan, „Inhibitory trypsyny z rodziny Bowmana–Birka–budowa oraz znaczenie w żywieniu ludzi i zwierząt”, *Med. Weter.*, t. 63, s. 276–281, 2007.
32. Borys Bronisław, „Substancje antyżywniowe w paszach roślinnych dla kóz”, *Wiadomości Zootech.*, t. XLV, nr 1–2, s. 55–65, 2007.

Pracę recenzowała: dr hab. Krzysztof Grzywnowicz, Uniwersytet Marii Curie–Sklodowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii

Proteazy serynowe i ich inhibitory jako nowoczesne narzędzia wykorzystywane w medycynie i biotechnologii

Proteazy serynowe według bazy MEROPS dzielą się na 13 klanów a wśród nich 51 rodzin i 21 podrodzin. Ich cechą charakterystyczną jest obecność w centrum aktywnym aminokwasów seryny i histydyny. Aktywność proteaz serynowych jest regulowana przez ich inhibitory zarówno naturalne (np. serpiny a wśród nich α -1-antytrypsyna, α -1-antychymotrypsyna) jak i syntetyczne (np. PMSF). Tak proteazy serynowe jak i ich inhibitory znalazły wiele zastosowań w medycynie i biotechnologii. Możemy wymienić następujące przykłady zastosowań: a) w przemyśle

spożywczym, w procesie oczyszczania preparatów enzymatycznych, wytwarzanie przy ich pomocy hydrolizatów białkowych – enzymy trawienne, b) w terapiach antyzakrzepowych – inhibitory trombiny (np. hirudyna, heparyna), c) zapobieganie chorobom: rozedmie płuc oraz marskości wątroby, jako czynniki hamujące aktywność elastazy – alfa-1-antytrypsyna , d) jako markery procesów nowotworzenia– PSA (antygen specyficzny dla prostaty), e) działanie terapeutyczne – nowotwory (skóry, płuc, wątroby, jelita grubego, sutka, trzustki), hipercholesterolemia, infekcje wirusowe – AIDS oraz leukoplakii – inhibitory trypsyny. Nie powinno więc dziwić wzmożone zainteresowanie badaczy tego typu białkami i ich naturalnymi inhibitorami jako potencjalnymi substancjami stosowanymi np. w farmakologii

Serine proteases and their inhibitors as a modern tool used in medicine and biotechnology

According to the MEROPS database, serine proteases are divided into 13 clans and among these 51 families and 21 subfamilies. Their characteristic feature is the presence of the serine and histidine amino acids in the active site. Serine protease activity is regulated by both their natural (e.g. serpins, more specifically: α -1-antitrypsin, α -1-antichymotrypsin) and synthetic inhibitors (e.g. PMSF). Serine proteases and their inhibitors have found many applications in medicine and biotechnology. We can cite the following application examples: a) in the food industry in the process of purifying enzyme preparations, and in protein hydrolysate production – digestive enzymes, b) as anticoagulants – thrombin inhibitors (eg hirudin, heparin), c) in the prevention of diseases: lung emphysema and liver cirrhosis, as factors inhibiting elastase activity – alpha-1-antitrypsin, d) as tumor markers – PSA (prostate specific antigen), e) as therapeutics for tumors (skin, lung, liver, colon, breast, pancreas), hypercholesterolemia, viral infections, AIDS and leukoplakia – trypsin inhibitors. The increased interest of researchers in this type of proteins and their natural inhibitors as potential materials used in pharmacology, among others, should not come as a surprise

Autorzy pracy:

Marcin Chilkiewicz, chilek90@gmail.com, Uniwersytet Marii Curie–Sklódowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Biologii i Biofizyki, Zakład Biochemii.

Magdalena Jaszek, magdalena.jaszek@poczta.umcs.lublin.pl, Uniwersytet Marii Curie–Sklódowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Biologii i Biofizyki, Zakład Biochemii.

Dawid Stefaniuk, dawid.stefaniuk@umcs.pl, Uniwersytet Marii Curie–Sklódowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Biologii i Biofizyki, Zakład Biochemii.

Anna Matuszewska, anna.matuszewska@poczta.umcs.lublin.pl, Uniwersytet Marii Curie–Sklódowskiej, Wydział Biologii i Biotechnologii, Instytut Biologii i Biofizyki, Zakład Biochemii.

Indeks autorów

Bednarski Jerzy	46	Kołodziej Ewa	26
Bilska Natalia	66	Kotuła Lidia	26
Chilkiewicz Marcin	98	Lewińska Małgorzata	16
Czerwonka Arkadiusz	6	Lipska Edyta	16
Dulemba Justyna	75	Matuszewska Anna	75, 98
Gasińska Karolina	46	Piróg Justyna	66
Gil-Kulik Paulina	26, 66	Rodzik Olga	56
Janiec Paulina	38, 46	Sobstyl Jan	38, 46
Jaszek Magdalena	75, 98	Stefaniuk Dawid	75, 98
Karwat Jolanta	26	Szajerska Anna	46
Kielbasa Sylwia	26	Zaleska Olga	56
Kołodziej Dorota	26	Żurek Aleksandra	6