

# **Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce**

## **Nauki przyrodnicze**

Część IV



[www.mlodzinaukowcy.com](http://www.mlodzinaukowcy.com)

Poznań 2018

**Redakcja naukowa**

dr Marcin Baran, IOR - PIB

dr inż. Jędrzej Nyckowiak, UPP

**Wydawca**

Młodzi Naukowcy

[www.mlodzinaukowcy.com](http://www.mlodzinaukowcy.com)

[wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com](mailto:wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com)

**ISBN (całość 978-83-65677-93-8)**

**ISBN (wydanie online 978-83-66139-03-9)**

**ISBN (wydanie drukowane 978-83-66139-02-2)**

Ilość znaków w książce: 528 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 13.2

Data wydania: czerwiec 2018

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

## Spis treści

<b>1. Badania stabilności emulsji kosmetycznych zawierających karotenoidy</b>	<b>7</b>
<i>Igielska-Kalwat Joanna</i>	
<b>2. Właściwości olejków eterycznych stosowanych w kosmetologii z uwzględnieniem skuteczności antybakteryjnej na przykładzie olejków eterycznych z Lawendy</b>	<b>18</b>
<i>Majszyk-Świątek Marta</i>	
<b>3. Modulacja allosteryczna receptorów opioidowych</b>	<b>24</b>
<i>Straszak Dominik, Drózd Monika, Aleksandra Dymek, Gabriela Widelska, Dariusz Matosiuk, Mateusz Tabin, Zborowski Mateusz</i>	
<b>4. Modulatory allosteryczne receptorów opioidowych</b>	<b>30</b>
<i>Straszak Dominik, Drózd Monika, Aleksandra Dymek, Gabriela Widelska, Mateusz Tabin, Mateusz Zborowski, Dariusz Matosiuk</i>	
<b>5. Biomechanika komórki i cytoszkielet</b>	<b>37</b>
<i>Szydłak Renata, Trojan Sonia</i>	
<b>6. Sposoby i mechanizmy migracji komórek</b>	<b>45</b>
<i>Szydłak Renata, Trojan Sonia</i>	
<b>7. Przechowywanie leków a ich trwałość</b>	<b>52</b>
<i>Anna Ploch, Małgorzata Maciążek-Jurczyk, Danuta Pentak, Agnieszka Szkudlarek, Lidia Szymczak-Mazur, Barbara Błońska-Fajfrowska</i>	
<b>8. Końcowe produkty glikacji białek – cichy zabójca</b>	<b>58</b>
<i>Ploch Anna, Szkudlarek Agnieszka, Pentak Danuta, Maciążek-Jurczyk Małgorzata</i>	
<b>9. Charakterystyka metamfetaminy i amfetaminy oraz wybrane sposoby ich wykrywania w próbkach biologicznych</b>	<b>65</b>
<i>Rutecka Sandra, Kukawka Rafał, Śmiglak Marcin</i>	
<b>10. Zastosowanie cieczy jonowych w przygotowywaniu próbek biologicznych zawierających metamfetaminę i amfetaminę</b>	<b>72</b>
<i>Rutecka Sandra, Kukawka Rafał, Śmiglak Marcin</i>	
<b>11. Zmiany szybkości rozpuszczania i przenikalności przez sztuczne układy błon ibuprofenu jako efekty oddziaływania z poloksamerem</b>	<b>78</b>
<i>Magdalena Paczkowska, Judyta Cielecka-Piontek</i>	
<b>12. Glycosaminoglycans mediate the function of cathepsin proteases</b>	<b>87</b>
<i>Bojarski Krzysztof K., Samsonov Sergey A.</i>	
<b>13. Programmable site-specific nucleases for target genome engineering</b>	<b>96</b>
<i>Magdalena Hryhorowicz, Natalia Mazurkiewicz, Joanna Zeyland, Agnieszka Nowak-Terpiłowska, Ryszard Słomski, Daniel Lipiński</i>	
<b>14. Transgeneza – rozwój metod wykorzystywanych w uzyskiwaniu zwierząt użytecznych w ksenotransplantacjach</b>	<b>102</b>
<i>Natalia Mazurkiewicz, Agnieszka Nowak-Terpiłowska, Magdalena Hryhorowicz, Joanna Zeyland, Daniel Lipiński</i>	
<b>15. Białko błonowe CD47 człowieka: właściwości i wykorzystanie w transgenezie świń na cele ksenotransplantacyjne</b>	<b>109</b>
<i>Natalia Mazurkiewicz, Agnieszka Nowak-Terpiłowska, Magdalena Hryhorowicz, Joanna Zeyland, Daniel Lipiński</i>	
<b>16. Rola ektosomów pochodzenia nowotworowego w angiogenezie</b>	<b>114</b>
<i>Surman Magdalena, Przybyło Małgorzata</i>	

- 17. Znaczenie glikozylacji białek w biologii mikropęcherzyków błonowych** **121**  
*Surman Magdalena, Przybyło Małgorzata*
- 18. Genetyczne uwarunkowania zdolności matematycznych** **128**  
*Julia Eliza Rodkiewicz, Małgorzata Gut*
- 19. Różnice w poziomie zdolności matematycznych w parach bliźniąt jedno- i dwujajowych** **133**  
*Rodkiewicz Julia, Gut Małgorzata, Matulewski Jacek, Goraczewski Łukasz, Mańkowska Katarzyna, Ciechalska Dominika, Mielewczyk Aleksandra, Witkowska Natalia, Duch Włodzisław*
- 20. Towards 2+1 photon tomography: Energy-based selection of two 511 keV photons and a prompt photon with the J-PET scanner** **141**  
*Masełek R., Krzemień W., Klimaszewski K., Raczyński L., Kowalski P., Shopa R., Wiślicki W., Białas P., Curceanu C., Czerwiński E., Dulski K., Gajos A., Głowacz B., Gorgol M., Hiesmayr B., Jasińska B., Kisielewska D., Korcyl G., Kozik T., Krawczyk N., Kubicz E., Mohammed M., Pawlik-Niedźwiecka M., Niedźwiecki S., Pałka M., Rudy Z., Sharma N.G., Sharma S., Silarski M., Skurzok M., Wieczorek A., Zgardzińska B., Zieliński M., Moskal P.*

### Przedmowa

Opracowanie przeznaczone jest dla wszystkich zainteresowanych zgłębianiem wiedzy z dość obszernego zakresu nauk przyrodniczych. Niniejsze wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” jest rezultatem współpracy w sferze naukowej, prezentujące dokonania młodych osób, które pragnęły podzielić się swoim dorobkiem naukowym z szeroką rzeszą czytelników. W serii opracowań zajmujących się dokonaniami młodych naukowców, zakres stawianych przed nimi zadań i działań ciągle rozszerza się. Nauki przyrodnicze zajmują się badaniem zachodzących zjawisk celem poznania rządzącymi nimi praw wykorzystując je dla dobra człowieka. W szybko rozwijających się naukach przyrodniczych, codziennie odkrywane są nowe zależności i powiązania z innymi obszarami nauki informujące o złożoności tej dziedziny. Obecnie utrwała się coraz bardziej i powszechniej przekonanie, że stosowanie jedynie kompleksowych badań z zakresu wszystkich dziedzin nauki, prowadzi do pełniejszego zrozumienia procesów. Konieczność znajomości zjawisk zachodzących w ówczesnym świecie wymusza na nas samych wdrożenie etapu samorozwoju poprzez zgłębienie wiedzy z wielu dziedzin nauki. Zagadnienia, którymi zajmują się badacze wymagają wykonania pewnej liczby doświadczeń. Doświadczenia te dają podstawę do wysuwania wniosków, które mogą wymagać dalszych, głębszych i wnikliwszych badań. W przyrodzie nie ma identyczności, więc uzyskane wyniki mogą być tylko pośrednimi w drodze tych badań.

Część pierwszej monografii poświęcono żywności i żywieniu, gdzie rozbito na elementy składowe, między innymi produkty mięsne, jak i drogi ich przetwarzania oraz przemian fizykochemicznych w celu wytwarzania produktów bardziej bezpiecznych i zdrowych. W drugiej części skupiono się na produkcji roślinnej, przedstawiając potencjał biotechnologiczny roślin i mechanizmy wpływu oraz ich pochodnych na życie człowieka. Wykorzystano także badania z zakresu zrównoważonego rolnictwa polepszające warunki fizykochemiczne gleby oraz roli instytucji rolniczych. W części trzeciej badania młodych naukowców ukierunkowane są w stronę zależności, roli oraz relacji grup organizmów zwierzęcych. Mowa jest tu o procesach destrukcyjnych, niedoborach oraz właściwościach struktur oraz strategiach działania jak również o stosowaniu nowych rozwiązań.

W części czwartej zgłębiane są zagadnienia nauk medycznych w oparciu o podejście do badanego procesu lub zależności ze strony genetycznej. Analizy zawierają oceny skuteczności i stabilności emulsji, olejków oraz próbek biologicznych w zastosowaniach biochemicznych przy użyciu całego spektrum metod badawczych.

Piąta z monografii zawiera rozdziały dotyczące działalności weterynaryjnej. Ukazane są tutaj zagrożenia na jakie narażeni jesteśmy ze strony zwierząt, a także całe bogactwo analiz przebiegów chorób, zaburzeń zwierząt domowych i gospodarskich. Nakreślono tu także role i genę zwierząt w symbiozie z człowiekiem.

Część szоста omawia i skupia się na oddziaływaniach wewnątrz środowiskowych. Badania zawarte w tej części opisują zależności i presję środowiska oraz powiązania składowych łańcuchów zależności biotycznych. Uwidocznione i proponowane są tutaj nowe narzędzia oceny i rozwiązania wpływające na bioróżnorodność fauny i flory.

Zespół redakcyjny ma nadzieję, że zawarte w tym opracowaniu wiadomości z zakresu nauk przyrodniczych umożliwią czytelnikom zrozumienie i zapoznanie się z wiadomościami niezbędnymi do otwarcia na wiele dyscyplin nauki oraz zjawisk zachodzących w otaczającym nas świecie. Mamy także nadzieję, że przystępność formy przypadnie Państwu do gustu i przyczyni się do propagowania dokonań młodych naukowców. Zdajemy sobie sprawę, że pełne i całkowite zrozumienie przedstawionych w zestawieniu prac o tak szerokiej tematyce jest rzeczą trudną i skomplikowaną lecz nie niemożliwą. Wszystko wymaga pewnej dyskusji wśród zainteresowanych oraz uzgodnienia własnych poglądów.

dr Marcin Baran  
Instytut Ochrony Roślin - PIB



## **1. Badania stabilności emulsji kosmetycznych zawierających karotenoidy**

Studies on stability of cosmetic emulsion containing carotenoids

Igielska-Kalwat Joanna

Wyższa Szkoła Zdrowia, Urody ul. Brzeźnicka 3 Poznań, Poland

Igielska-Kalwat: joanna.igielska@wp.pl

Słowa kluczowe: wielkość cząstek, emulsje kosmetyczne, badania trwałości

### **Streszczenie**

Emulsje kosmetyczne znalazły powszechne zastosowanie w kosmetyce. Stosuje się je między innymi jako produkty dostarczające składniki aktywne. Przemysł kosmetyczny poszukuje coraz to nowych substancji biologicznie – czynnych. Karotenoidy – grupa związków barwnych. Ze względu na wysokie właściwości przeciwutleniające karotenoidy są jedną z najczęściej wykorzystywanych w kosmetykach substancji aktywnych. Stabilność preparatów kosmetycznych jest krytycznym parametrem istotnym dla przemysłu farmaceutycznego, jak i kosmetycznego. W niniejszej pracy przeprowadzono badanie przy użyciu metod analitycznych takich jak: wielokrotne rozpraszanie światła i dyfrakcję laserową. Metody te mają na celu określenie stabilności różnych emulsji zawierających karotenoidy. Wyniki obu metod wykazały, że stabilność emulsji zależy głównie od metod przygotowania jak i od rodzaju zastosowanego emulgatora.

### **1. Wstęp**

W ostatnich latach, dzięki postępowi technologicznemu, można zaobserwować szybki rozwój form kosmetycznych oraz preparatów farmaceutycznych. Testy stabilności tych produktów są bardzo rygorystycznie przestrzegane. Testy te przeprowadzane są w celu potwierdzenia odpowiednich norm fizyko-chemicznych uzyskanych produktów (rozporządzenie (WE) nr 1223/2009 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 30 listopada 2009 r. W sprawie produktów kosmetycznych). W uproszczeniu stabilność emulsji oznacza zdolność do utrzymywania wielkości cząstek w niezmienionej postaci przez cały okres ich przechowywania (Curt 1994, Tadros 2008, Lindgren i in.1996). Procesy destabilizacji emulsji są wynikiem różnych zjawisk, takich jak śmietanowanie, sedymentacja, flokulacja, koalescencja, inwersja faz lub dojrzewanie Ostwalda, które mogą występować oddzielnie lub jednocześnie (Curt 1994, Tadros 2008). Test stabilności przeprowadzony metodą klasyczną, która obejmuje obserwację próbki w różnych warunkach, jest bardzo czasochłonny ze względu na różnorodność i złożoność kosmetyków i produktów farmaceutycznych. Głównym parametrem odpowiedzialnym za przewidywania okresu ważności formulacji, jest zmiana temperatury. Należy wziąć pod uwagę warunki przechowywania i transportu, takie jak wysokie i niskie temperatury, ekspozycja na światło słoneczne i wilgotność w okresie przydatności do spożycia produktu. Dlatego preparaty są przechowywane w różnych warunkach i są okresowo analizowane od 3 do 6 miesięcy. Identyfikacja zjawisk niestabilności może być skrócona przy użyciu metody optycznej, takiej jak wielokrotne rozpraszanie światła (MLS). Nawet niewielkie zmiany w stabilności emulsji można określić bardzo wcześniej i szybko. Ponadto ta metoda nie obejmuje rozcieńczania emulsji, a zatem struktura emulsji nie ulega zakłóceniu. Powszechnie znane emulsje, takie jak olej-w-wodzie (o / w) i woda-w-oleju (w / o), są stosowane nie tylko w aby poprawić nasz wygląd i łatwość aplikacji. Mogą być również stosowane w celu dostarczania aktywnych składników i poprawy ich dystrybucja i przenikania. Karotenoidy są ważną grupą organicznych barwników. Są one podzielone na dwie klasy, takie jak karoteny, które są węglowodorowymi i nie zawierają tlenu ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -karoteny, likopen) i ksantofili, które zawierają tlen (luteina, zeaksantyna, astaksantyna) (Morganti i in. 2009), (Igielska-Kalwat i in. 2013a, Igielska-Kalwat i in.2013b, Igielska-Kalwat i in, 2012, Scarmo i in, 2010). Karotenoidy znalazły zastosowanie w przemyśle kosmetycznym ze względu na ich właściwości przeciwutleniające (Yamashita 2002, Anuncuato i da Rocha Filho 2012). Są w stanie hamować tworzenie wolnych rodników i stymulować fibroblasty do

produkcji kolagenu i elastyny, dzięki czemu mogą wpływać na poprawę struktury, elastyczność i jędrność skóry (Cabrić i Pokrywka 2010).

Celem tego badania było określenie stabilności różnych emulsji zawierających karotenoidy ( $\beta$ -karoten, likopen, astaksantyna) za pomocą metod analitycznych: dyfrakcji laserowej (LD) i wielokrotnego rozpraszania światła. Odpowiednia wielkość cząstek i trwałość preparatu kosmetycznego zapewniają odpowiednią jakość produktu (Lee i Chen 2002), (Gärtner i in, 1997, Hallmann i in 2007, Toor i in. 2006, Johnson i in, 1997, Lemarchand i in, 2003a). Dlatego uzyskane wyniki mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia aspektów stabilności preparatów zawierających związki aktywne.

## 2. Materiały i metody

### 2.1 Badane materiały i preparaty

Skład preparatów przedstawiono w tabeli 1.

**Tab. 1.** Skład chemiczny preparatów.

Nazwa próbki	Skład	Firma	Ilość [% $\pm$ 0.01]
<b>Emulsja typu O/W (A)</b>	Olej słonecznikowy		12.62
	Monostearynian glicerolu	Sigma-Aldrich	3.89
	Alkohol cetylowy	Sigma-Aldrich	5.82
	Woda destylowana		77.66
	Karotenoidy:		
	$\beta$ - karoten	TriMen Chemicals	0.01
Astaksantyna	TriMen Chemicals		
Likopen	TriMen Chemicals		
<b>Emulsja typu O/W (B)</b>	Creagel EZ 7 *	Creations Couleurs	10.0
	Alphaflow 20 **	Creations Couleurs	17.00
	Woda destylowana		72.99
	Karotenoidy:		
	$\beta$ - karoten	TriMen Chemicals	0.01
	Astaksantyna	TriMen Chemicals	
Likopen	TriMen Chemicals		

\* Creagel EZ7 – polyacylamide, hydrogenated polydecene, laureth-7

\*\* Alphaflow 20 – hydrogenated polydecene

#### 2.1.1. Przygotowanie emulsji O/ W (A)

Składniki fazy olejowej (olej słonecznikowy, monostearynian glicerolu i alkohol cetylowy) ogrzewano do temperatury 70° C za pomocą mieszadła magnetycznego z regulacją ogrzewania. Równocześnie podgrzano wodę do temperatury 70° C. Po stopieniu wszystkich składników fazy olejowej powoli dodano je do wody. Następnie mieszaninę intensywnie mieszano i ochłodzono. Następnie emulsję podzielono na trzy części. Do każdej porcji dodano różne karotenoidy - astaksantynę,  $\beta$ -karoten lub likopen.

#### 2.1.2. Przygotowanie emulsji O / W (B)

Creagel EZ7 mieszano z Alphaflow 20, aż mieszanina stała się jednorodna. Następnie dodano powoli wodę mieszając obie fazy na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej.



Emulsję podzielono na trzy porcje. Do każdej porcji dodano różne karotenoidy - astaksantynę,  $\beta$ -karoten lub likopen.

### 2.1.3. Przygotowanie emulsji W / O

Fazę olejową (lanolina, olej słonecznikowy, wosk pszczeli i alkohol cetylowy) ogrzewano do temperatury 70° C, aż wszystkie składniki uległy stopieniu. Równocześnie podgrzano wodę do temperatury 70° C. Podczas mieszania stopionych składników fazy olejowej na mieszadło magnetyczne dodawano powoli wodę. Uzyskaną mieszaninę pozostawiono do ochłodzenia do temperatury pokojowej. Następnie emulsję podzielono na trzy części. Do każdej porcji dodano różne karotenoidy - astaksantynę,  $\beta$ -karoten lub likopen.

## 2.2. Badania stabilności

### 2.2.1. Test stabilności wykonany za pomocą metody wielokrotnego rozpraszania światła

Pomiary stabilności przeprowadzono natychmiast po przygotowaniu emulsji oraz w różnych odstępach czasowych przez 100 dni, stosując Turbiscan Lab Expert (Formulation, Francja). Stabilność zmierzono w dwóch różnych warunkach, w temperaturze pokojowej (25° C) i w podwyższonej temperaturze (45° C). Pomiedzy pomiarami próbki przechowywano w świetle dziennym i w ciemności w temperaturze 25° C, a także w 45° C. Uzyskane wyniki przedstawiono jako dane wstecznie rozproszone w funkcji wysokości próbki. Przed analizą próbki umieszczono w cylindrycznych szklanych probówkach, unikając tworzenia się pęcherzyków.

### 2.2.2 Analiza rozkładu wielkości cząstek metodą dyfrakcji laserowej

Rozkłady wielkości cząstek preparatów zawierających karotenoidy analizowano za pomocą Mastersizer 2000 (Malvern, Wielka Brytania) wyposażonego w jednostkę dyspergującą Hydro. Prędkość pompy została ustalona na 2000 rpm. Zebrane dane zostały obliczone na podstawie teorii Frauhofera i Mie w celu uzyskania rozkładu wielkości cząstek analizowanych próbek (podręcznik użytkownika analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000). Pomiary prowadzono w temperaturze pokojowej w wodzie destylowanej. Przeprowadzono trzykrotne powtórzenie, a następnie określono średnią wartość.

Współczynniki załamania światła emulsji pokazano w tabeli 2.

**Tab. 2.** Współczynniki załamania światła analizowanych emulsji.

Typ emulsji	Współczynnik załamania światła
Emulsja O/W (A) z astaksantyną	1.340
Emulsja O/W (B) z astaksantyną	1.386
Emulsja W/O z astaksantyną	1.479
Emulsja O/W (A) z $\beta$ - karotenem	1.345
Emulsja O/W (B) z $\beta$ - karotenem	1.397
Emulsja W/O z $\beta$ - karotenem	1.471
Emulsja O/W (A) z likopenem	1.342
Emulsja O/W (B) z likopenem	1.385
Emulsja W/O z likopenem	1.454

Wyniki przedstawiono jako wartości procentowe  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$  i  $d(0,9)$ :

- $d(0,1)$  [ $\mu\text{m}$ ] - 10% rozkładu cząstek jest poniżej tej wartości,
- $d(0,5)$  [ $\mu\text{m}$ ] - mediana rozkładu cząstek,
- $d(0,9)$  [ $\mu\text{m}$ ] - 90% rozkładu cząstek jest poniżej tej wartości.

Wielkość kropelki podano jako średnią średnicę powierzchni objętości,  $D(3,2)$  i średnią średnicę objętości,  $D[4,3]$ .  $D[3,2]$  podaje informację o średniej średnicy, w której spada większość cząstek, a parametr  $D[4,3]$  jest wrażliwy na zmiany wielkości cząstek w procesie destabilizacji

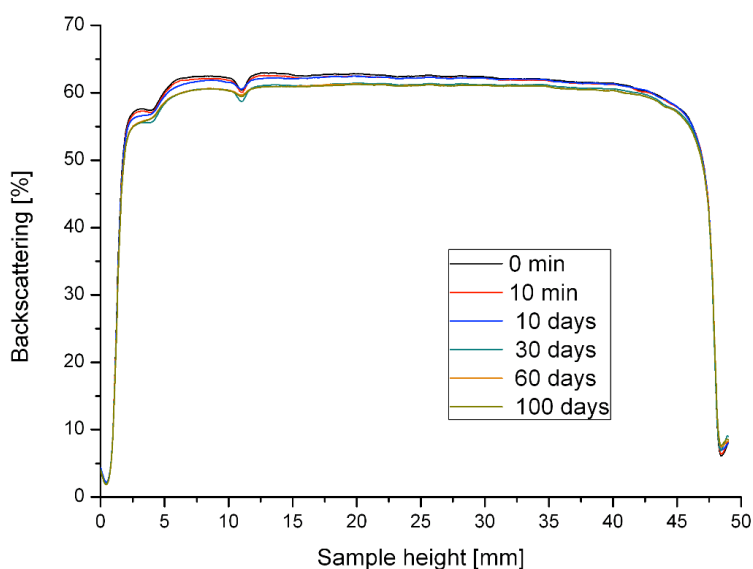
(Relikn i Sourdet 2005). Pomiary przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Farmakopei Stanów Zjednoczonych "Pomiar dyfrakcji światła w rozmiarze cząstek" (USP29-NF24).

### 3. Wyniki i dyskusja

Karotenoidy ulegają fotodegradacji i degradacji termicznej (Rodriguez - Amaja i Kimura, 2004). Uważa się, że degradacja związku aktywnego może również wpływać na stabilność całego układu. Dlatego badania trwałości preparatów zawierających karotenoidy przeprowadzono w świetle dziennym, a także w ciemności, w celu zminimalizowania ryzyka rozkładu karotenoidów. Pomiary prowadzono również w różnych warunkach temperaturowych. Analizy w temperaturze pokojowej pozwalają przewidzieć stabilność produktu przechowywanego w sklepach oraz w domu. Pomiary w temperaturze 45° C są nazywane testami przyspieszonego starzenia. Badania te umożliwiają analizę stabilności emulsji w ekstremalnych warunkach przechowywania. Otrzymane preparaty wykazywały różne właściwości organoleptyczne. Emulsja O/ W (B) miała lekką konsystencję i biały kolor. Podczas gdy emulsja typu W/ O miała gęstą konsystencję z lekko żółtą barwą, a emulsja O/W (A) była gruba i biała.

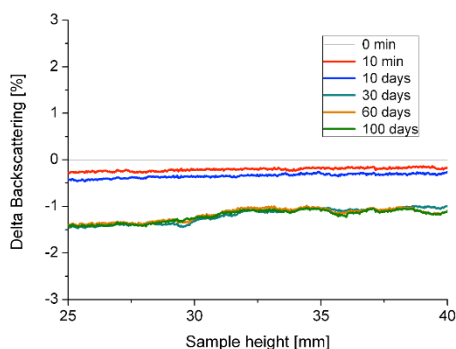
#### 3.1. Badania stabilności wykonane z wykorzystaniem wielokrotnego rozpraszanie światła

Pomiary natężenia światła rozproszonego wstecz pozwalają na wykonanie analizy stabilności emulsji bez jej rozcieńczania. Zasada tej analizy opiera się na zmianach wielkości cząstek lub zmienności frakcji objętościowej kropelek (Celia i in 2009a). Intensywność emisji zależy głównie od trzech parametrów: średnica cząstek, udział objętościowy cząstek i współczynnik załamania ciągłej fazy i zdyspergowanej fazy (Lemarchand i in 2003b, Vandamme i Soetaert, 2006, Mengual i in 1999) . Po analizie otrzymano dwa różne profile emulsji. Analizowano tylko zmiany profili rozpraszania wstecznego wszystkich otrzymanych emulsji, ponieważ sygnał transmisji był we wszystkich przypadkach zerowy (próbki nieprzezroczyste). Strumienie rozpraszania wstecznego pokazano na rzędnej, a wysokość próbki na osi odciętych. Wyniki badania wielokrotnego rozpraszania światła dla emulsji O/W (B) z astaksantyną podano na (Rys. 1). Regularny wzorzec rozpraszania wstecznego próbki wskazywał na brak zjawisk sedymentacji i śmietanowania. Jednak dane rozpraszania wstecznego uzyskane po 100 dniach wykazały spadek intensywności BS w stosunku do całkowitej wysokości próbki. Zmiany te są związane z niewielkim zróżnicowaniem wielkości cząstek.



**Rys. 1.** Profile rozpraszania wstecznego emulsji O/ W (B) z astaksantyną w temperaturze pokojowej.

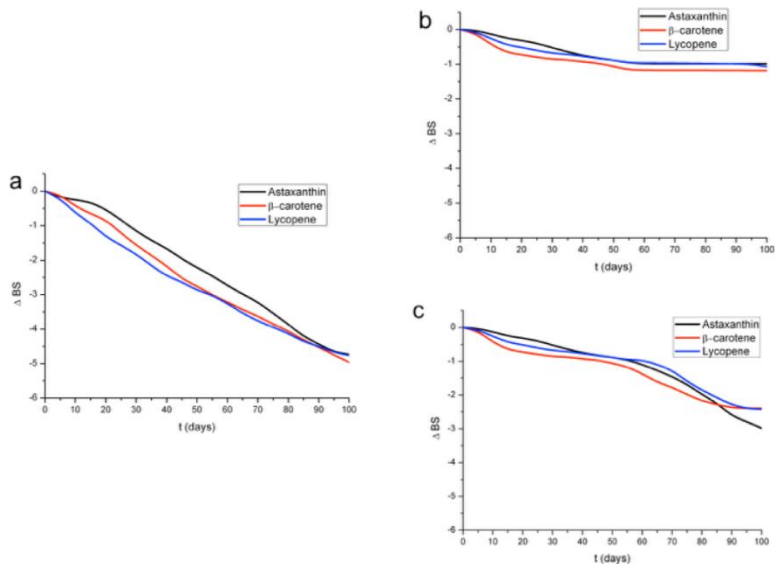
Aby w sposób bardziej przystępny zbadać występujące zmiany i łatwiej dostrzec zmiany profili, próbki analizowano w trybie referencyjnym. W związku z tym pierwszy profil został odjęty od wszystkich innych profili, a na rzędnych delta zastosowano rozpraszanie wsteczne ( $\Delta$ BS). Na rysunku 2 przedstawiono profile emulsji O/W (B) z astaksantyną. Zmiany wielkości cząstek były wyświetlane przez zmianę poziomu rozproszenia wstecznego (od 0 do -1,5%) na wysokości próbki. Pierwszy profil, w czasie  $t = 0$ , jest na linii delta BS = 0%. Następnie cząsteczki po pewnym czasie łączą się, co wywołuje postępujący spadek delta rozpraszania wstecznego. Intensywność światła wstecznego rozpraszania zmniejszała się, co odpowiadało wzrostowi wielkości cząstek, określanemu mianem flokulacji. Zjawisko to może wystąpić, gdy wielkość cząstek jest większa niż długość fali padającego światła (Mengual i in, 1999). Należy wspomnieć, że wartości BS zawsze się zmieniają (przesuwają się w górę lub w dół) o rozmiar cząstek (Vandamme i Soetaert 2006). Informacje te zastosowano do ilościowego określenia kinetyki flokulacji (Chauvierre i in, 2004, Palazolo i in, 2005). Zaobserwowano, że w ciągu 100 dni maksimum rozpraszania wstecznego wyniosło -1,5%. Ta wartość wskazywała, że zaobserwowano tylko nieznaczne zmiany. Należy wspomnieć, że preparaty są traktowane jako niestabilne, gdy zmiana jest większa niż 10% albo jako wartość dodatnią lub ujemną w skali graficznej rozpraszania wstecznego (Celia i in, 2009).



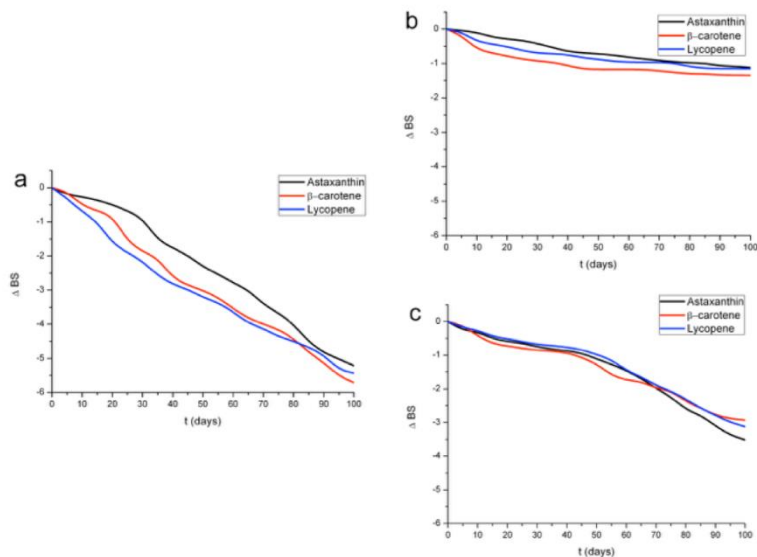
**Rys. 2.** Profile  $\Delta$ BS emulsji O/W (B) z astaksantyną w temperaturze pokojowej.

Na rysunku 3 przedstawiono profile ABS emulsji O/W A (a), emulsji O/W B (b) i emulsji W/O (c) zawierającej karotenoidy przechowywane w ciemności w RT. Wyniki wskazują, że flokulacja była głównym mechanizmem destabilizacji emulsji. Zjawisko to obserwuje się, gdy cząstki zetkną się i sklejają ze sobą. W zależności od rodzaju preparatów zmieniono wielkość cząstek. Zachowanie flokulacji próbek analizowano przez wykreślenie ewolucji czasu na poziomie rozpraszania wstecznego delta, aby umożliwić porównanie próbek. Na (rys. 3b) profile b  $\Delta$ BS emulsji O/W (B) znajdują się na tym samym poziomie niezależnie od użytych karotenoidów. Wielkość cząstek w kroplach zmieniła się nieznacznie (-1%) w ciągu 40 dni, a następnie pozostała stabilna. Bardzo podobne profile  $\Delta$ BS otrzymano dla emulsji O/W (B) z karotenoidami, które były przechowywane w świetle dziennym (rys. 4b). Delta BS emulsji O/W B pozostała prawie niezmienną podczas przechowywania przez 100 dni (-1%), co wskazuje na jego dużą stabilność. Z drugiej strony pokazano na rysunku. 3a, że po 100 dniach delta BS emulsji O/W (A) z karotenoidami była 5 razy większa niż w przypadku emulsji O/W (B). Szybka flokulacja w emulsji O/W niezależnie od rodzaju karotenoidu miała miejsce podczas 100 dni przechowywania. Bardzo podobne profile delta BS uzyskano, gdy ta sama emulsja była przechowywana w tym samym okresie w świetle dziennym (ryc. 4 b). Obie emulsje (na bazie Creagel i emulsji O / W) były typu olej w wodzie, jednak zostały przygotowane przy użyciu różnych procedur, które mogłyby mieć wpływ na ich stabilność. Emulsja O /W (A) jest typową tradycyjną emulsją, która została wytworzona w procesie na gorąco głównie z powodu surowców, które występują w postaci stałej i powinny zostać stopione przed zmieszaniem z fazą wodną. Drugą, emulsję O/W (B), opartą na Creagelu, przygotowano w procesie na zimno bez topienia składników. Obecność Creagel EZ7, który jest stosowany jako auto-emulgator, wpływał na utrzymanie najniższego napięcia międzypowierzchniowego między fazami, a tym samym ustabilizował tę emulsję. W porównaniu

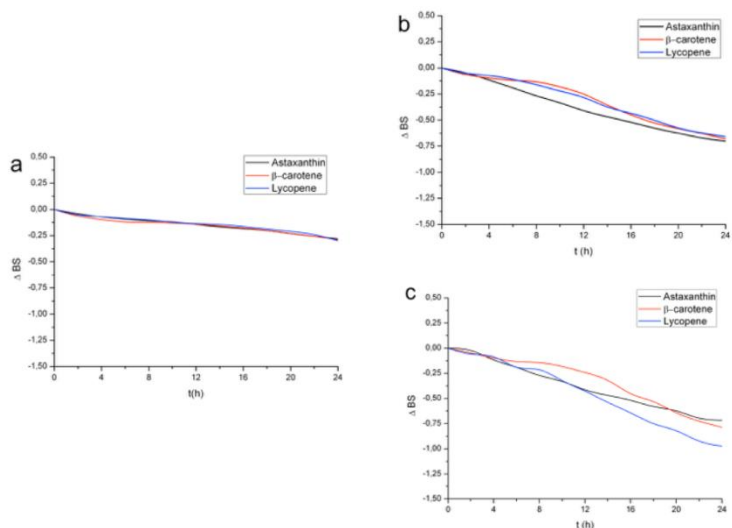
z emulsją W/O przygotowaną w procesie na gorąco, emulsja oparta na Creagelu była bardziej stabilna. Maksymalne rozproszenie wsteczne delta osiągnęło -3% po 100 dniach przechowywania emulsji W/O. Agregacja cząstek nastąpiła po przechowywaniu w ciemności (ryc. 3 c) i w świetle dziennym (ryc. 4 c). Również w tym przypadku obecność  $\beta$ -karotenu, astaksantyny i likopenu nie wpływała na stabilność preparatu, a uzyskane wyniki były bardzo podobne dla każdej emulsji W/O z karotenoidem.



**Rys. 3.** Profile  $\Delta$ BS emulsji O/W A (a), emulsji O/W B (b) i emulsja W/O (c) zawierające karotenoidy przechowywane w ciemności w temperaturze pokojowej.



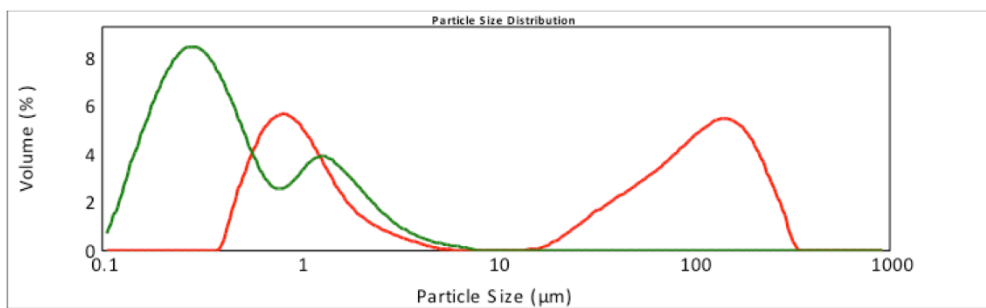
**Rys. 4.**  $\Delta$ B profile emulsji O/W (Creagel) (a), emulsja O/W (b), emulsja W/O (c) przechowywane w świetle dziennym w RT. Pomiary przeprowadzone w temperaturze 45 ° C wykazały jedynie niewielkie zmiany w delta BS dla wszystkich emulsji zawierających karotenoidy (rys. 5). Największą zmianę wielkości cząstek zaobserwowano w przypadku emulsji W/O. We wszystkich przypadkach zmiany w delta BS mieściły się w granicach normy. Udowodniło to, że emulsje te mogą być stabilne nawet w wyższej temperaturze



**Rys. 5.** Pomiar przeprowadzone w temperaturze 45 ° C.

### 3.2. Badania stabilności za pomocą dyfrakcji laserowej (LD)

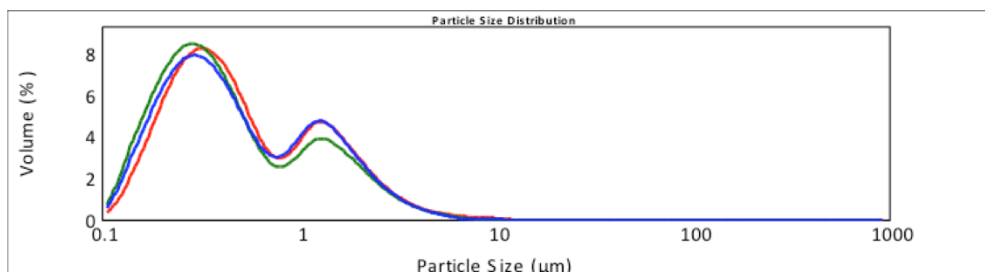
Rozkład wielkości cząstek zmierzono metodą dyfrakcji laserowej. Dla każdej próbki użyto ultradźwięków do rozbitcia potencjalnie istniejących aglomeratów i uzyskania dyspersji cząstek pierwotnych. Wpływ zastosowanych ultradźwięków na rozkład wielkości cząstek emulsji O/W (A) z  $\beta$ -karotenem przechowywanym w ciemności pokazano na (rys. 6). Objętość ważona, średnia średnica D (4,3) zmieniła się z  $70,14 \pm 0,44$  na  $0,73 \pm 0,04$   $\mu\text{m}$  i powierzchnia objętościowa, średnia średnica D (3,2) zmniejszyła się z  $2,07 \pm 0,01$  do  $0,35 \pm 0,01$   $\mu\text{m}$  po zastosowaniu ultradźwięków (20 kHz). Udowodniło to, że aglomeraty zostały rozbite przez działanie ultradźwięków. Ten sam efekt zaobserwowano również w przypadku emulsji O/W (A) z likopenem. Średnią objętość objętościowa D (4,3) emulsji O/W (A) z astaksantyną zmieniła się odpowiednio z  $155,30 \pm 3,01$  na  $0,68 \pm 0,05$   $\mu\text{m}$  i  $51,58 \pm 5,09$  na  $0,79 \pm 0,01$   $\mu\text{m}$ .



**Rys. 6.** Wpływ ultradźwięków na rozkład wielkości cząstek emulsji O / W (A) zawierającej  $\beta$ -karoten zmagazynowany w ciemności (czerwona linia - pomiary wykonane bez ultradźwięków i zielona linia - pomiary wykonane z ultradźwiękami, 20 kHz).

Dodatkowo, zmniejszenie średniej powierzchni objętościowej średnicy D (3,2) od  $2,06 \pm 0,02$  do  $0,36 \pm 0,01$   $\mu\text{m}$  (emulsja O / W z likopenem) i od  $1,46 \pm 0,05$  do  $0,36 \pm 0,01$   $\mu\text{m}$  (emulsja O / W (A) z astaksantyną) również zaobserwowano. Wyniki te są zgodne z danymi uzyskanymi dla emulsji O/W (A) z karotenoidami z zastosowaniem wielokrotnego rozpraszania światła, ponieważ

wykazano tendencję tego preparatu do tworzenia agregatów. Dodatkowo, dzięki zastosowaniu ultradźwięków otrzymano dyspersje cząstek pierwotnych i można porównać wpływ każdego karotenoidu na rozkład wielkości cząstek. Na rysunku 7 przedstawiono rozkład wielkości cząstek emulsji O/W (A) zawierającej astaksantynę,  $\beta$ -karoten i likopen. Wyniki pomiarów dyfrakcji laserowej nie wykazały znaczących zmian w rozkładzie wielkości kropeł między emulsją O/W (A) zawierającą różne karotenoidy.



**Rys. 7.** Rozkład wielkości cząstek emulsji O/W z astaksantyną (linia czerwona),  $\beta$ -karoten (zielona linia), likopen (niebieska linia) przechowywane w ciemności.

Należy wspomnieć, że również warunki przechowywania nie wpływały na rozkład wielkości cząstek emulsji O/W (A). Wszystkie badane emulsje O/W zawierające różne karotenoidy miały podobny rozkład wielkości kropełek niezależnie od tego, czy były przechowywane w świetle dziennym, czy też w powietrzu, ciemność (tabela 3).

**Tab. 3.** Rozkład wielkości cząstek i średnia ważona objętość D [4,3] i D [3,2] emulsji O/W (A) przechowywanej w różnych warunkach.

Emulsja typu O/W (A)	Przechowywane w ciemności [ $\mu\text{m}$ ]				
	D <sub>(4,3)</sub>	D <sub>(3,2)</sub>	D <sub>(1,0)</sub>	D <sub>(5,0)</sub>	D <sub>(9,0)</sub>
<b><math>\beta</math>-karoten</b>	0.73±0.01	0.34±0.01	0.17±0.01	0.38±0.01	1.77±0.01
<b>Likopen</b>	0.74±0.02	0.36±0.01	0.18±0.02	0.40±0.05	1.73±0.04
<b>Astaksantyna</b>	0.79±0.01	0.35±0.01	0.17±0.02	0.40±0.01	1.81±0.04
	Przechowywane w świetle dziennym [ $\mu\text{m}$ ]				
	D <sub>(4,3)</sub>	D <sub>(3,2)</sub>	D <sub>(1,0)</sub>	D <sub>(5,0)</sub>	D <sub>(9,0)</sub>
<b><math>\beta</math>-karoten</b>	0.73±0.05	0.34±0.03	0.16±0.01	0.36±0.02	1.75±0.11
<b>Likopen</b>	0.77±0.02	0.36±0.01	0.18±0.01	0.41±0.01	1.81±0.04
<b>Astaksantyna</b>	0.77±0.02	0.37±0.03	0.19±0.03	0.42±0.02	1.71±0.03

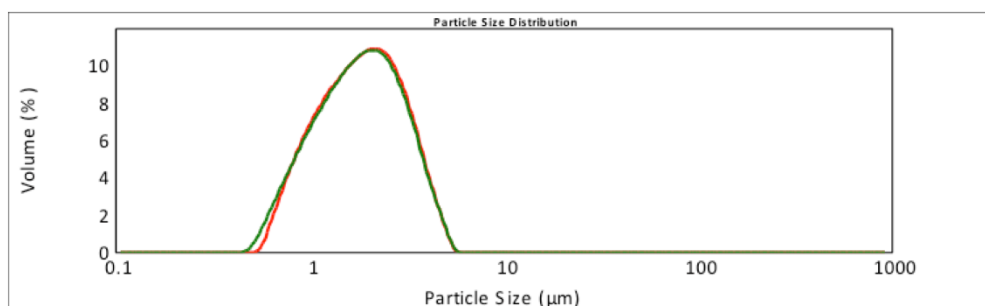
Efekt ultrasonikacji widoczny był również w przypadku emulsji W/O zawierających karotenoidy. Po zastosowaniu ultradźwięków aglomeraty w emulsji W/O rozpraszano stopniowo, aż do uzyskania pierwotnego rozmiaru cząstek. Wpływ ultradźwięków na rozkład wielkości kropeł emulsji przechowywanej w ciemności przedstawiono na rysunku 8. Przed użyciem ultradźwięków wykryto jeden szeroki pik pomiędzy 6 a 580  $\mu\text{m}$ . Po zastosowaniu ultradźwięków pik przesunął się w stronę mniejszego zakresu wielkości cząstek. Dodatkowo obserwowano spadek średniej ważonej objętościowo średnicy od  $15,01 \pm 4,40$  do  $3,72 \pm 0,19$   $\mu\text{m}$  oraz zmianę średniej powierzchni D objętościowej (3,2) z  $87,05 \pm 3,65$  do  $0,69 \pm 0,03$   $\mu\text{m}$ . Zgodnie z oczekiwaniami z powodu zastosowania ultradźwięków to samo zjawisko zaobserwowano również w przypadku innych dwóch emulsji W/O, w których średnia ważona D objętościowa zmieniła się z  $219,63 \pm 15,00$  na  $3,79 \pm 0,09$   $\mu\text{m}$  (emulsja W/O z  $\beta$ -karotenem) i od  $236,58 \pm 8,40$  do  $3,81 \pm 0,09$   $\mu\text{m}$  (emulsja W/O z dodatkiem likopenu). Ponadto, po zastosowaniu ultradźwięków, zmniejszenie średniej objętościowej powierzchni wynosi od  $94,97 \pm 4,45$  do  $0,61 \pm 0,06$   $\mu\text{m}$  dla emulsji W/O z  $\beta$ -karotenem i od  $103,27 \pm 3,20$  do  $0,65 \pm 0,20$   $\mu\text{m}$  dla emulsji W/O z  $\beta$ -likopenem. Wszystkie te wyniki potwierdziły dane uzyskane w wielu pomiarach rozpraszania światła, w których cząstki emulsji O/W wykazywały tendencję do aglomeracji. Dane przedstawione w tabeli 4 nie wykazały istotnych różnic w rozkładzie

wielkości cząstek emulsji W/O zawierającej różne karotenoidy przechowywane w tych samych warunkach.

**Tab. 4.** Rozkład wielkości cząstek i średnia ważona objętość D [4,3] i D [3,2] emulsji W/O przechowywanej w ciemności.

Przechowywane w ciemności [ $\mu\text{m}$ ]					
Emulsja typu W/O	D <sub>(4,3)</sub>	D <sub>(3,2)</sub>	D <sub>(0,1)</sub>	D <sub>(0,5)</sub>	D <sub>(0,9)</sub>
<b><math>\beta</math>-karoten</b>	3.91±0.26	0.61±0.06	0.20±0.01	2.84±0.43	9.74±0.32
<b>Likopen</b>	3.81±0.09	0.65±0.02	0.21±0.01	3.16±0.18	8.78±0.22
<b>Astaksantyna</b>	3.74±0.11	0.69±0.03	0.22±0.01	2.84±0.14	9.08±0.15

Jedynie w przypadku emulsji O/W (B) zmiany w rozkładzie wielkości cząstek nie były obserwowane po zastosowaniu ultradźwięków. Na rysunku 9 przedstawiono wpływ ultradźwięków na rozkład wielkości cząstek w emulsji O/W (B) z  $\beta$ -karotenem przechowywanym w świetle dziennym. Objętościowa ważona średnia średnica D (4,3) i średnia powierzchnia objętościowa D (3,2) powierzchni pozostawały stałe podczas pomiarów wykonywanych z i bez użycia ultradźwięków ( $2,05 \pm 0,01 \mu\text{m}$  i  $1,60 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ). Dane te są zgodne z wynikami uzyskanymi przy użyciu wielokrotnego rozpraszania światła, przy czym emulsja O/W (B) była najbardziej stabilną emulsją i nie zaobserwowano prawie żadnych zmian w wielkościach cząstek. Ponadto należy dodać, że emulsja O/W (B) zawierająca karotenoidy wykazywała również dobrą stabilność w czasie, ponieważ rozkład wielkości kropelek nie zmieniał się znacząco.



**Rys. 9.** Wpływ ultradźwięków na rozkład wielkości cząstek emulsji O/W (B) z  $\beta$ -karotenem przechowywanej w świetle dziennym (czerwona linia - pomiary wykonane bez ultradźwięków, zielona linia - pomiary wykonane za pomocą ultradźwięków).

#### 4. Wnioski

Wyniki dowiodły, że nowe metody analityczne, takie jak wielokrotne rozpraszanie światła i dyfrakcja laserowa, mogą być z powodzeniem stosowane w celu określenia stabilności różnych formułacji zawierających karotenoidy. Najbardziej stabilna okazała się emulsja typu O/W (B), która została przygotowana w procesie na zimno bez stapiania składników. Obecność autoemulgatora może mieć wpływ na utrzymanie najniższego napięcia międzyfazowego między fazami, w ten sposób zwiększono stabilność tego preparatu. Rozkład wielkości cząstek emulsji typu O/W (B) pozostawał stały podczas pomiarów wykonywanych z ultradźwiękiem i bez niego. Ponadto nie zaobserwowano znaczących zmian w wielkości kropelek emulsji niezależnie od użytych karotenoidów. Okazało się, że dodanie substancji czynnej, takiej jak astaksantyna,  $\beta$ -karoten lub likopen, nie miało wpływu na stabilność emulsji. Ponadto okazało się, że wielkość cząstek nie zmieniała się znacząco w różnych warunkach. Stabilność emulsji zależy głównie od metod przygotowania i zastosowanego emulgatora. Na podstawie przeprowadzonych badań, stwierdziłam że wielokrotne rozpraszanie światła (MLS) pozwala na charakteryzację emulsji bez rozcieńczania, a dyfrakcja laserowa (LD) umożliwia

charakterystykę emulsji w szerokim zakresie wielkości cząstek (0,01 do 1000  $\mu\text{m}$ ). Udowodniono, że metody te charakteryzują się szybkim i prostym sposobem opisanie zjawisk niestabilności w emulsjach. Proponowane techniki, takie jak MLS (oparte na analizie czasowych fluktuacji intensywności światła rozproszonego) i LD (na podstawie analizy zależności kątowej natężenia światła rozproszonego za pomocą teorii Mie) muszą być stosowane w celu dokładnej i powtarzalnej weryfikacji integralności dowolna emulsja.

## 5. Literatura

- Anunciato TP, da Rocha Filho PA (2012). Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. *J. Cosmet. Dermatol.* 11: 51-54.
- Celia C, Trapasso E, Cosco D, Paolino D, Fresta M (2009). Turbiscan lab expert analysis of the stability of ethosomes and ultradeformable liposomes containing a bilayer fluidizing agent. *Coll. Surf. B. Biointerfaces.* 72: 155-160.
- Chauvierre C, Labarre D, Couvreur P, Vauthier C (2004). Long-circulating copolymers based on their emulsifying properties. *Colloid Polymer Sci.* 282: 1097-1104.
- Curt C (1994). Méthodes d'évaluation de la stabilité des émulsions. Principes, applications, avantages et inconvénient. *Sci. Aliment.* 14 : 699-724.
- Emulsion stability and testing, Technical Brief, Particle Sciences Drug Development, Manufacturing & Delivery Services, 2011.
- Estrin NF, Akerson, JM (2000). *Cosmetic Regulation in a Competitive Environment.* CRC Press, New York, pp.1-480.
- Gärtner C, Stahl W, Sies H (1997). Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *Am. J. Clin. Nutr.* 66: 116-122.
- Hallmann E, Rembiałkowska E, Lipowski, J, Marszałek, K. (2007). The estimation of nutritive and sensory value of the pasteurized tomato juice from organic and conventional production. *J. Res. Appl. Agric. Eng.* 55: 105-111.
- Igielska-Kalwat J, Gościńska J, Nowak N (2013a). Antyoksydacyjne właściwości karotenoidów. *Kosmetyka i Kosmetologia.* 96: 93-96.
- Igielska-Kalwat J, Gościńska J, Nowak I (2013b). Zastosowanie astaksantyny w preparatach kosmetycznych. *Kosmetologia Estetyczna.* 2: 83-85.
- Igielska-Kalwat J, Wawrzyńczak W, Nowak I (2012). Karotenoidy i ich zastosowanie w przemyśle kosmetycznym na przykładzie  $\beta$ - karotenu. *Chemik.* 2: 140-144.
- Lemarchand C, Couvreur P, Vauthier C, Costantini D, Gref R (2003a). Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. *Int. J. Pharm.* 254: 77-82.
- Lemarchand C, Couvreur P, Besnard M., Costantini D, Gref R (2003b). Novel polyester-polysaccharide nanoparticle. *Pharm. Res.* 20: 1284-1292.
- Lindgren A, Sjöström M, Wold S (1996). Quantitative-structure-effect relationship for some technical nonionic surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 863-875.
- Mengual O, Meunier G, Cayre I, Puech K, Snabre P (1999). TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analyses. *Talanta.* 50: 445-456.
- Morganti P, Martins D, Morganti G (2009). Aktywność luteiny w skórze. *SOFW- Journal – Polish edition.* 1: 13-18.
- Palazolo GG, Sorgentini DA, Wagner JR (2005). Coalescence and flocculation in soy proteins in comparison with soy protein isolates. *Food Hydrocoll.* 19: 595-604.
- Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the council of 30 November 2009 on cosmetics products.
- Relikn P, Sourdet S (2005). Factors affecting fat droplet aggregation in protein-stabilized emulsions. *Food Hydrocolloid.* 19:3, 503-511.
- Rodriguez – Amaja D.B, Kimura M, (2004). Harvestplus handbook for carotenoid analysis. Harvest Plus Technical Monographs. No. 2, International Food Policy Research Institute (IFPRI), International Center for Tropical Agriculture (CIAT) Washington, pp. 1-58.



- Tadros, TF, (2008). Emulsion Science and Technology. Colloids and Interface Science Series. Wiley-VCH, Verlag, Weinheim, pp. 1-344.
- Toor RK, Savage GP, Lister CE (2006). Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. J. Food Comp. Anal. 19, 1-10.
- User manual of particle size analyzer Mastersizer 2000.
- Vandamme EJ, Soetaert W (2006). Personal care products via fermentation and biocatalysis processes [in] Biotechnology in Personal Care. Cosmetics Sciences and Technology Series. Taylor & Francis, New York, pp. 27-56.
- Yamashita E (2002). Cosmetic benefit of dietary supplements containing astaxanthin and tocotrienol on human skin. Food Style. 21: 112-1177.

## **2. Właściwości olejków eterycznych stosowanych w kosmetologii z uwzględnieniem skuteczności antybakteryjnej na przykładzie olejków eterycznych z Lawendy**

Properties of essential oils used in cosmetology with regard to antibacterial effectiveness on the example of Lavender essential oils

Majszyk-Świątek Marta

Wydział Nauk o Zdrowiu, Wyższa Szkoła Inżynierii i Zdrowia w Warszawie

Majszyk-Świątek Marta: majszyk.m@gmail.com

Słowa kluczowe: drobnoustroje, rośliny, bezpieczeństwo

### **Streszczenie**

Olejki eteryczne stanowią ciągły przedmiot badań. Dzięki swoim właściwościom zostały wykorzystane także w kosmetologii, jako substancje wpływające na eliminowanie drobnoustrojów na skórze. Wstęp pracy stanowi informacje o olejkach eterycznych i ich zastosowaniu. Ich działanie wiąże się z zastosowaniem odpowiedniej dawki, umożliwiającej skuteczne działanie, przy możliwie jak najskuteczniejszej redukcji skutków ubocznych. Wykorzystywanie olejków eterycznych w pracy kosmologa wiąże się z wpisaniem w obecnie panujący nurt zdrowego stylu życia i powrotu do holistycznego podejścia do klienta. W opracowaniu znalazły się informacje o działaniu olejków eterycznych na drobnoustroje ze szczególnym uwzględnieniem olejków pozyskiwanych z Lawendy. Podsumowanie stanowi konkluzję stosowania olejków eterycznych jako substancji przeciwdrobnoustrojowych oraz wpisanie się w nurt zdrowego stylu życia, coraz powszechniejszy wśród klientów gabinetów kosmologicznych.

### **1. Wstęp**

Zainteresowanie wyrobami naturalnymi w tym olejkami eterycznymi to wynik rosnącej mody na zdrowy tryb życia, poszukiwania rozwiązania problemu powszechnie występujących alergii, często o niezdiagnozowanym podłożu, oraz towarzyszących im schorzeń dermatologicznych, które bardzo często kojarzone są z surowcami syntetycznymi. (Śmigiełski i in. 2008).

Na drodze przeprowadzonych do tej pory różnorodnych badań substancje naturalne, w tym przypadku olejki eteryczne, są w większości lepiej tolerowane przez organizm niż związki otrzymywane na drodze chemicznej. Nie są one jednak do końca bezpieczną alternatywą, gdyż niektóre z nich działają drażniąco na skórę i wywołują alergię, w momencie dobrania złej dawki. (Kleniewska 1998).

Olejki eteryczne w odpowiednim stężeniu są alternatywą dla wielu środków antybakteryjnych stosowanych w kosmetologii. Mogą być wykorzystywane jako preparaty wspomagające leczenie przy trądziku pospolitym, zmianach bakteryjnych skóry czy innych schorzeniach skóry z udziałem drobnoustrojów.

### **2. Opis zagadnienia**

Olejki eteryczne stanowią płynne, wieloskładnikowe mieszaniny lotne, nierozpuszczające się w wodzie, mające określony zapach. Są produktami skomplikowanych procesów biosyntezy zachodzących w roślinie. Bardzo dobrze rozpuszczają się w alkoholach, chloroformie, eterze, benzenie, tłuszczach, olejach roślinnych lub mineralnych, woskach i innych olejkach eterycznych. Są cieczkami na ogół bezbarwnymi lub jasnożółtymi, a niekiedy o innych charakterystycznych barwach (Wójcik 1999).

Związki organiczne jakie można znaleźć w olejkach eterycznych to terpeny (mono i seskwiterpeny), alkohole (terpenowe, tłuszczowe i alifatyczne), pochodne fenylopropanu, aldehydy, ketony, estry, laktony, tlenki (np. siarki, azotu), nityle i kwasy organiczne (Kasprzykowska i in. 2014). Zdarza się, że niektóre składniki gromadzą się w olejkach w bardzo dużej ilości tak, że

krystalizują w nich i mogą być łatwo otrzymany bezpośrednio lub przez wymrażanie olejku (Ożarowski i Jaroniewski 1987).

Wśród około 400 tysięcy gatunków roślin występujących na świecie, zdolność do syntezy olejków ma tylko nieco więcej niż 2 tysiące gatunków, należących do około 295 rodzin. Najwięcej roślin syntetyzujących olejki eteryczne pochodzi ze strefy zwrotnikowej. Najwięcej olejków można pozyskać z roślin sklasyfikowanych w rodzinach wargowych, blaszkowatych, złożonych, imbirowatych, skalnicowatych i bodziszkowatych. Spotykanne są często u roślin nagonasiennych.

Olejki są produktami przemiany materii u roślin. Pełnią funkcję atraktantu (przyciągają owady), repelentu (odstraszaają szkodniki), ochronną (antyseptyczną i promienioochronną) oraz informacyjną. Są wytwarzane i magazynowane w wysoko rozwiniętych strukturach anatomicznych rośliny, takich jak gruczoły, komórki, mieszki i kanały olejkowe zewnątrz- lub wewnątrz-tkankowe (Kasprzykowska i in. 2014). Olejki eteryczne pozyskuje się ze świeżych i suchych części roślin: kwiatów, nasion, owoców, liści, kory, drewna, korzeni lub kłączy. Częstym zjawiskiem jest otrzymywanie z różnych części tej samej rośliny różniących się znacznie składem olejków (Wójcik 1999). Rodzaj wydzielanego aromatu zależy głównie od gatunku i odmiany rośliny. Jednak ważne jest także w jakim stadium rozwojowym znajduje się aktualnie roślina, jakie są warunki klimatyczne oraz pora dnia, gdyż wszystkie te aspekty mogą wpływać na właściwości pozyskiwanego olejku. Ilość olejków znajdujących się w roślinach nie jest liczbą sztywną i waha się w bardzo szerokich granicach od części tysięcznych procenta do kilkunastu procent (Ożarowski i Jaroniewski 1987).

Najpowszechniejszą metodą otrzymywania olejków eterycznych z surowców roślinnych jest destylacja z parą wodną. Surowce mięsiste, zawierające duże ilości olejków pozyskuje się przez wyłaczanie. Można je także ekstrahować z różnymi rozpuszczalnikami takimi jak alkohole. W ostatnich latach próbuje się metody ekstrakcji skroplonymi gazami np. CO<sub>2</sub>. Proces ten jest drogi, ale jego zaleta polega na otrzymaniu olejków mających swój endogeny skład i oryginalny zapach (Wójcik 1999).

Olejki eteryczne stosowane miejscowo charakteryzują się dużą skutecznością antybakteryjną, gdyż zawierają lipofilowe związki o bardzo małych cząsteczkach, zdolnych do penetracji do głębszych warstw skóry i działają na lipidowe części błon komórkowych. Odpowiednio dobrane mieszanki naturalnych olejków eterycznych pełnią funkcje przeciwdrobnoustrojowe oraz surowców o określonej aktywności biologicznej. Dodatkowo wprowadzenie do składu kosmetyku olejków w znaczącym stopniu zmniejsza udział tradycyjnych substancji bakteriobójczych i grzybobójczych stosowanych w kosmetykach (Herman 2013). Silna aktywność biologiczna olejków eterycznych warunkuje ich najskuteczniejsze właściwości antydnoboustrojowe, ze wszystkich substancji naturalnych i sztucznych. Charakterystyczną cechą jest synergizm działania różnych olejków w mieszankach i olejków wraz z antybiotykami. Efekt inhibitujący olejków może być wzmocniony przez zastosowanie odpowiednich czynników, m.in. niskie pH, niska temperatura, obecność substancji typu chelatorów czy kwasu mlekowego. Wymienione związki zwiększają przepuszczalność błon komórkowych, drobnoustrojów i czynią je wrażliwymi na działanie czynników bójczych. Obecnie rośnie znacząco oporność drobnoustrojów na dostępne preparaty przeciwdrobnoustrojowe. Prowadzone są badania nad możliwościami wykorzystywania produktów roślinnych nie tylko jako preparaty działające bezpośrednio biostatycznie lub biobójczo, ale też jako czynniki modelujące oporność mikroorganizmów lub obniżające ich wirulencję (Budzyńska i Różalska 2012).

Jednym z przedstawionych mechanizmów toksyczności olejków eterycznych lub ich terpenoidowych składników wobec bakterii jest koagulacja cytoplazmy oraz permeabilizacja błony komórkowej, która powoduje nadmierną utratę jonów (wapnia, potasu) i w rezultacie obniża potencjał błonowy, zaburzając funkcjonowanie pomp protonowych i związanego z tym zmniejszenia puli wewnątrzkomórkowego ATP. Uszkodzenie ściany oraz błony komórkowej prowadzi w ostateczności do lizy komórki bakterii. Cytotoksyczne działanie olejków eterycznych zaobserwowano in vitro w stosunku do wielu rodzajów drobnoustrojów, zwłaszcza bakterii Gram – dodatnich. Olejki eteryczne są coraz częściej brane pod uwagę jako potencjalne substancje przeciwbakteryjne. Zaletą stosowania ich w terapii jest brak możliwości powstania oporności wśród bakterii oraz ich mała

toksyczność (Król i in. 2013). Ich cechą jest także szybki efekt i długotrwałość działania przeciwbakteryjnego.

Szereg aktywności składników olejków eterycznych można przedstawić jako: fenole > aldehydy > alkohole > estry/etery > węglowodory. Najsilniejsze działanie mają fenole ze względu na kwasowy charakter grupy hydroksylowej, która może tworzyć wiązania wodorowe z centrum aktywnym enzymu. Olejki, gdzie głównym składnikiem są fenole, działają na bakterie najsilniej, mając jednocześnie najszersze spektrum działania. Trochę mniej aktywne są olejki, gdzie dominują w składzie alkohole (Kalemba 1998).

Oceniając aktywność przeciwdrobnoustrojową olejków eterycznych wykorzystuje się najczęściej ogólnie przyjęte metody do badania właściwości antybiotycznych, z pewnymi przekształceniami, wynikającymi ze szczególnych właściwości olejków. Należy pamiętać, że olejki są lotne więc doświadczenie dobiera się tak aby nie odparowywały w trakcie analizy. Dodatkowo olejki nie rozpuszczają się w wodzie więc przed wprowadzeniem ich do hodowli należy je rozpuścić w odpowiednim rozpuszczalniku organicznym, który jednocześnie nie będzie miał wpływu na wzrost i rozwój drobnoustrojów.

Metody oceny właściwości bakteriobójczych olejków eterycznych

Do dwóch podstawowych grup metod, używanych do oceny aktywności antybakteryjnej olejków eterycznych należą :

- metoda agarowo-dyfuzyjna (krążkowa i studzienkowa)
- metoda rozcieńczeń/mikrorozcieńczeń (agarowa w hodowli płynnej) (Kalemba 1998).

Metoda agarowo-dyfuzyjna jest najbardziej rozpowszechniona, choć daje tylko wynik ilościowy. Umożliwia ona ocenienie w prosty sposób stopnia zahamowania wzrostu mikroorganizmów oraz ich zmiany morfologiczne. Stopień skuteczności olejku ocenia się przez wielkość strefy zahamowania rozwoju mikroorganizmu na płytce, podawanej jako średnica tej strefy. W metodzie rozcieńczeń popularna stała się metoda mikrorozcieńczeń. Hodowlę agarową prowadzi się na płytkach Periego, a płynne w kolbach stożkowych. W hodowli, w kolbie określa się indeks zahamowania rozwoju (procent), a w hodowlach, w próbkach turbidymetrycznie lub po przeniesieniu danej ilości hodowli na płytkę agarową, po inkubacji odbywa się liczenie kolonii. Dla wszystkich metod rozcieńczeniowych wyniki podaje się określając indeks zahamowania rozwoju mikroorganizmów podawany w procentach oraz liczony w stosunku do próby kontrolnej bez olejku eterycznego, a także określając minimalne stężenie – MIC (ang. Minimal Inhibitory Concentration) (lub maksymalne rozcieńczenie - MID) hamujące rozwój mikroorganizmu lub minimalne stężenie bójcze – MBC (ang. Minimal Bactericidal Concentration). Minimalne stężenie hamujące charakteryzuje się najczęściej jako najniższe stężenie olejku eterycznego w podłożu, przy którym nie obserwuje się żadnego wzrostu mikroorganizmów. Najniższe wyjściowe stężenie olejku, dla którego nie obserwuje się wzrostu, to minimalne stężenie bójcze. Czasem jako minimalne stężenie letalne – MLC (ang. Minimal Lethal Concentration) przyjmuje się stężenie, przy którym zniszczone jest > 99,9% wyjściowego inoculum (Kalemba 1998).

Określono, że składniki olejków eterycznych przez posiadanie właściwości lipofilowych, niszczą ściany komórkowe i błonę cytoplazmatyczną bakterii i grzybów, co prowadzi do wycieku cytoplazmy i jej koagulacji. Olejki eteryczne hamują także syntezę DNA, RNA, protein i polisacharydów oraz produkcję enzymów. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa olejków eterycznych uwarunkowana jest aktywnością poszczególnych składników antybakteryjnych w nich zawartych. Występuje korzystny efekt synergistyczny składnika danego olejku lecz może być on także niekorzystny przez efekt antagonistyczny, osłabiający działanie olejku eterycznego w porównaniu z działaniem jego składników (Adams i in. 1996).

Lawenda

Lawenda (*Lavandula L.*) jest rośliną z rodziny wargowych, liczących około 48 polimorficznych gatunków. Najefektywniejsze pozyskiwanie (3-3,5 tony świeżych kwiatostanów

z 1 ha) odbywa się w trzecim, czwartym roku rośliny. Kwiatostany zostają ścięte po upływie 1-1,5 tygodnia od rozkwitnięcia pierwszych kwiatów. Z kwiatostanów od razu pozyskuje się olejek.

Największe znaczenie olejkowe mają trzy gatunki:

- Lawenda wąskolistna inaczej zwana prawdziwą, z której pozyskuje się olejek lawendowy,
- Lawenda szerokolistna (tzw. Spika), która hodowana jest do uzyskania olejku spikowego,
- Lawendyna stanowiąca hybrydę dwóch w/w gatunków, służąca do pozyskiwania olejku lawandynowego.

Lawenda to wiecznie zielony półkrzew (40-70 cm), występujący dziko w krajach basenu Morza Śródziemnego. Ma małe, pachnące, niebiesko-fioletowe kwiaty, których kwitnienie przypada na przełom lipca i sierpnia. Hodowana na plantacjach w takich krajach jak Francja, Bułgaria, Hiszpania, Portugalia, Włochy i kraje byłego ZSSR. Zbiory kwiatów są rozłożone w czasie, nawet do 40 dni, gdyż odmiany wczesne zaczynają kwitnąć już w połowie czerwca, a późne na początku sierpnia. Kwiatostany pozyskiwane są mechanicznie poprzez ścięcie kwiatostanów i poddanie ich od razu destylacji z parą wodną. Proces ten trwa około półtorej godziny, po czym destylat zbiera się do flaszek florentyńskich, dekantuje, suszy i filtruje (Góra i Lis 2012).

#### Olejek lawendowy

Olejek lawendowy stanowi bezbarwną, ewentualnie żółtą ciecz, o bardzo charakterystycznym, świeżym zapachu. Wykryto w olejku ponad 300 składników. Należy pamiętać że stężenie składników olejku zmienia się w zależności od pory roku, warunków atmosferycznych oraz od dojrzałości rośliny w czasie zbioru. Proces pozyskiwania olejku także powoduje różnice w jego składzie. Przy wcześniej wspomnianej destylacji z parą wodną wzrasta zawartość  $\alpha$ -terpineolu i linalolu w stosunku do octanu linalilu w porównaniu z olejkami otrzymanymi drogą ekstrakcji nadkryształicznej.

Do najważniejszych składników należą linalol (zawartość 20-40%) oraz octan linalilu (15-45%) zawarte w olejku w formie lewoskrętnej. Dzięki ich ilości rozpoznaje się jakość olejku. (Kasprzykowska i in. 2014).

Farmakopea Polska VIII określa w olejku lawendowym zawartość następujących składników: limonen (poniżej 1%), cyneol (poniżej 2,5%), oktan-3-on (0,1-2,5%), kamfora (poniżej 1,2%), linalol (20-40%), octan linalilu (25-46%), terpinen-4-ol (0,1-6%), octan lawandulilu (powyżej 0,2%), lawanduol (powyżej 0,1%),  $\alpha$ -terpineol (poniżej 2%) (Farmakopea Polska 2008).

Olejek lawendowy został jako jeden z pierwszych wykorzystany jako środek antyseptyczny i przyspieszający gojenie się ran, oparzeń i podrażnień skóry, łagodzi on skutki ukąszeń owadów, poparzenia słoneczne, różne rodzaje trądziku, egzemy, stany zapalne skóry i dermatozy (Brud i Konopacka-Brud 2001). Wykazano także że olejek lawendowy zdolny jest do zahamowania wzrostu metycylinowrażliwych – MSSA (ang. Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus) oraz metycylinoopornych szczepów S. aureus – MRSA (ang. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus), w stężeniu niższym niż 1%. Dowiedziono że linalol jest aktywnym, przeciwbakteryjnym związkiem przeciw standardowemu szczepowi S. aureus (Król i in. 2013).

Olejek ten ma bardzo ważne przeciwwskazanie. Nie może być używany przez kobiety w pierwszych miesiącach ciąży, szczególnie jeśli wcześniej poroniły. Olejek ten nie pełni silnej funkcji przeciwbakteryjnej w przypadku poważniejszych infekcji. Jednak to nie wyklucza jego wysokiej użyteczności jako środek profilaktyczny lub stosowany miejscowo przeciw infekcjom zewnętrznym.

Olejek lawendowy ze względu na dość wysoką cenę pozyskiwania może być fałszowany przez dodanie tańszego olejku lawandynowego lub spikowego, albo przez dodanie syntetycznych produktów (Kasprzykowska i in. 2014).

### Olejek spikowy

Pozyskuje się go z podsuszonego na powietrzu ziela Lawendy szerokolistnej. Rocznie produkuje się około 200 ton olejku spikowego, z czego 75% w Hiszpanii i Portugalii. Z jednej tony ziela otrzymuje się około 10 kilogramów olejku, wydajność to 1%.

Jest to żółtobrazowa ciecz o kwiatowo-kamforowym zapachu. Wykryto w nim ponad 350 związków z czego głównymi są linalol (25-45%), 1,8-cyneol (25-35%) oraz kamfora (10-25%) (Góra i Lis 2012).

### Olejek lawandynowy

Powstała w procesie samorzutnej hybrydyzacji lawandyna jest bardzo bujna wzrostem i plennością co przekłada się na ilość pozyskiwanego z niej olejku. Z 1 tony uzyskuje się 25-40 kilogramów olejku. Najbardziej znanymi odmianami to Abrialis, Grosso, Provence i Super. Główne składniki olejku stanowią linalol (20-40%), octan linalilu (15-30%), 1,8-cyneol (5-15%) i kamfora (5-15%). Z lawendyny dodatkowo pozyskuje się hydrolat mający bardzo dobre właściwości bakteriobójcze na skórę. Jego głównymi składnikami są: linalol (60%),  $\alpha$ -terpineol (9%), geraniol (5%) oraz terpinen-4-ol (4%)(Góra i Lis 2012).

Olejek lawandynowy ma najlepsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe szerokiego spektrum, przez dużą zawartość różnorodnych składników antybakteryjnych w składzie. W pracy wyszczególniono ilości substancji przeciwdrobnoustrojowych przy każdym z opisywanych olejków.

## 3. Podsumowanie i wnioski

Olejki eteryczne stanowią cenny surowiec dla przemysłu kosmetycznego, zapewniając pożądane właściwości, ochronę mikrobiologiczną oraz przyjemny zapach. Ich obecność bardzo często pozwala wyeliminować bądź znacząco zredukować w wyrobie zużycie szkodliwych substancji pochodzenia syntetycznego. Tym samym olejki eteryczne nie mają negatywnego wpływu na środowisko naturalne. Obiecujące wyniki badań *in vitro* uzasadniają konieczność i zachęcają do prowadzenia dalszych analiz potwierdzających skuteczność antybakteryjną olejków eterycznych *in vivo* oraz ocenę ewentualnych działań niepożądanych. Kosmetolodzy coraz chętniej sięgają po olejki eteryczne ze względu na upodobania samych klientów oraz trendy panujące na rynku wspomniane na początku pracy. Właściwości antybakteryjne olejków eterycznych przekładają się na stosowanie ich w formułacjach kosmetycznych. Dzięki nim możliwe jest zmniejszenie lub całkowita eliminacja konserwantu przy zachowaniu bezpieczeństwa mikrobiologicznego produktu.

## 4. Literatura

- Adams S, Kuna B, Weidenbörner M (1996) Mycelial deformation of *Caladosporium herbarum* due to the application of eugenol or carvacrol. *Journal of Essential Oil Research*, 8:535-545.
- Brud WS, Konopacka- Brud I (2001) *Pachnąca apteka. Tajemnice aromaterapii*. Wydawnictwo "Pagina", Warszawa.
- Budzyńska A, Różalska B (2012) Potencjalne wykorzystanie roślinnych olejków eterycznych w zwalczaniu zakażeń z udziałem biofilmów drobnoustrojów. *Życie Weterynaryjne*, 87(3):213-215.
- Budzyńska A, Więckowska-Szakiel M, Kalemba D, i in. (2009) Weryfikacja metodycznych parametrów oznaczania przeciwbakteryjnej aktywności olejków eterycznych. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*, 61:281-287.
- Farmakopea Polska VIII (2008) PTFarm, Warszawa.
- Góra J, Lis A (2012) Najcenniejsze olejki eteryczne część I. Monografie Politechniki Łódzkiej, Łódź.
- Herman A (2013) Właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejków eterycznych w kosmetykach. *Cosmetology today*, 2/2013:5-9.

- Kalemba D (1998) Przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze właściwości olejków eterycznych. *Postępy Mikrobiologii*, 38(2):185-203.
- Kasprzykowska R, Kołodziejczyk A.S, Jankowska E, i in. (2014) Preparatyka i analiza związków naturalnych. Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk.
- Kleniewska D (1998) Alergia na kosmetyki. *Aromaterapia*, 3(13):28-32.
- Król SK, Skalicka-Woźniak K, Kandefér-Szerszeń M, i in. (2013) Aktywność biologiczna i farmakologiczna olejków eterycznych w leczeniu i profilaktyce chorób infekcyjnych. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 67:1000-1007.
- Ożarowski A, Jaroniewski W (1987) Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie. Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych, Warszawa.
- Śmigielski K, Sikora M, Majewska M, i in. (2008) Zastosowanie olejków eterycznych w kosmetykach naturalnych i organicznych. *Polish Journal of Cosmetology*, 11(2):89-107.
- Wójcik P (1999) Olejki eteryczne w kosmetyce. *Wiadomości Zielarskie*, 41(07-08):24-25.

### **3. Modulacja allosteryczna receptorów opioidowych**

Allosteric modulation of opioid receptors

Straszak Dominik<sup>(1)</sup>, Drózd Monika<sup>(2)</sup>, Aleksandra Dymek<sup>(3)</sup>, Gabriela Widelska<sup>(3)</sup>,  
Dariusz Matosiuk<sup>(1)</sup>, Mateusz Tabin<sup>(4)</sup>, Zborowski Mateusz<sup>(5)</sup>

<sup>(1)</sup> Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

<sup>(2)</sup> Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

<sup>(3)</sup> Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

<sup>(4)</sup> Oddział Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Metabolicznych 4 Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką we Wrocławiu

<sup>(5)</sup> Klinika Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej Centralnego Szpitala Klinicznego MSWiA w Warszawie

Opiekun naukowy: prof. dr hab.n.farm. Dariusz Matosiuk

Dominik Straszak: dominik.straszak@gmail.com

Słowa klucze: biased agonizm, PAM, arestyna

#### **Abstrakt**

Receptory sprzężone z białkiem G (GPCR) pełnią zasadniczą funkcję w większości procesów fizjologicznych regulujących pracę komórki. Relatywnie niedawno opisano skomplikowane mechanizmy aktywacji i inhibicji tych receptorów. Dzięki intensywnie prowadzonym badaniom w ośrodkach naukowych na całym świecie, poszerzamy naszą wiedzę na temat struktury tych receptorów oraz ich wpływu na przebieg procesów komórkowych. Receptory opioidowe należą do rodopsynopodobnych GPCR (klasa A), a ich aktywacja powoduje uruchomienie kaskady wewnątrzkomórkowych przekaźników z finalnym skutkiem w postaci analgezji. Receptory opioidowe stanowią główny cel działania leków przeciwbólowych stosowanych w terapii zarówno ostrego i przewlekłego bólu. Klasyczne opiaty takie jak morfina czy kodeina obok silnego znieczulenia, wywołują również szereg działań niepożądanych, w tym uzależnienie, depresję ośrodka oddechowego, euforię czy tolerancję, które to skutki ograniczają możliwość ich szerokiego wykorzystania. Ostatnie dekady przyniosły przełom w podejściu do modulacji aktywności receptorów opioidowych. Nowe kierunki badań obejmują zastosowanie biased agonistów oraz ligandów allosterycznych, które wykazują bezpieczniejszy profil działania klinicznego, a przez to w niedalekiej przyszłości będą mogły uzupełnić terapię przeciwbólową, a może nawet zastąpić obecnie stosowane analgetyki.

#### **1. Wstęp**

Przez wiele lat projektowanie nowych leków opierało się w głównej mierze na poszukiwaniu takich związków, które wpasowywałyby się do centrum aktywnego receptora, a przez to wywierały działanie agonistyczne bądź antagonistyczne. Nowym kierunkiem aktualnie prowadzonych programów badawczych jest modulacja allosteryczna, dzięki której można wpływać na zdolność receptorów do wiązania się z ligandem ortosterycznym, który z kolei aktywuje szlaki wewnątrzkomórkowe. Otrzymanie tego rodzaju związków otwiera nową drogę do farmakoterapii celowanej na konkretne podtypy receptorów, a jednocześnie mogłoby wyeliminować działania niepożądane typowe dla klasycznych ligandów ortosterycznych. Szczególne znaczenie odgrywają tutaj receptory z rodziny GPCR, które stanowią cel działania około połowy aktualnie stosowanych leków przeciwbólowych. Ze względu na ich zbliżoną budowę aminokwasową, otrzymanie silnie wybiórczych dla ligandów jest niemal nieosiągalne, natomiast wykorzystanie centrum allosterycznego receptora może być kluczem do rozwiązania tego problemu. W leczeniu wykorzystywane są modulatory allosteryczne receptorów GABA, adenylinowych, glutaminowych



oraz muskarynowych. Przez ostatnie lata trwały intensywne prace nad otrzymaniem pozytywnych modulatorów receptorów opioidowych, co może stanowić przełom w farmakoterapii bólu (Law i in. 2013).

## **2. Opis zagadnienia**

Leki przeciwbólowe są jednymi z najczęściej stosowanych farmaceutyków na świecie. Chronicznego bólu każdego dnia doświadcza około 20% społeczeństwa europejskiego (Tölle 2016). Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) stanowią pierwszy wybór w drabinie analgetycznej. Blokują one cyklooksyzgenazę prostaglandynową (COX), a przez to dają efekt przeciwbólowy, przeciwzapalny i przeciwgorączkowy. Jednak ze względu na swoje działania niepożądane, w tym uszkodzenie śluzówki żołądka, ototoksyczność, nefrotoksyczność, hepatotoksyczność, zaburzenia krzepnięcia krwi oraz wiele innych, a jednocześnie stosunkowo niską skuteczność w leczeniu silnego bólu, nierzadko istnieje potrzeba zastosowania silniejszych leków przeciwbólowych, takich jak opioidy. Dostępne na rynku klasyczne opiaty wykazują szereg działań ubocznych, takich jak depresja oddechowa, uzależnienie, senność, euforia, zawroty głowy i rozwój tolerancji, co znacznie ogranicza ich powszechne zastosowanie. Stąd koniecznym wydaje się poszukiwanie nowych substancji terapeutycznych, które dając efekt silnej analgezji, jednocześnie będą wykazywały dobry profil bezpieczeństwa klinicznego. (Kostowski i Herman 2013).

Jednym z nowych kierunków badań naukowych jest poszukiwanie pozytywnych modulatorów allosterycznych (PAM). Związki te stabilizują konformację aktywną receptorów opioidowych i ułatwiają związanie ligandów ortosterycznych, a przez to zwiększają ich powinowactwo i/lub siłę działania (Bernstein i Dillon 2014). Zastosowanie modulatorów allosterycznych może pozwolić na ograniczenie dawek klasycznych opiatów lub wręcz rezygnację z ich wykorzystania, a przez to wyeliminowanie działań niepożądanych typowych dla tej klasy leków. Dodatkowym argumentem za wykorzystaniem modulatorów jest brak możliwości ich przedawkowania oraz wytworzenia tolerancji ze względu na występowanie efektu wysycenia. Obecnie trwają intensywne badania biologiczne nad pierwszymi otrzymanymi ligandami z tej grupy (Wang i in. 2009).

## **3. Przegląd literaturowy**

### **Budowa i występowanie receptorów opioidowych**

Receptory opioidowe należą do klasy rodopsynopodobnych białek sprzężonych z białkiem G (klasa A) oraz nadrodziny receptorów metabotropowych. Zbudowane są z pojedynczego łańcucha peptydowego tworzącego 7 membran transbłonowych połączonych trzema pętlami zewnątrz- i czterema wewnątrzkomórkowymi. Koniec posiadający wolną grupę aminową znajduje się na zewnątrz komórki (N-koniec), natomiast koniec karboksylowy (C-koniec) położony jest po wewnętrznej stronie w cytozolu i jest miejscem fosforylacji receptora w procesie desentytyzacji. Według najnowszej klasyfikacji wyróżniamy trzy typy klasycznych receptorów opioidowych: DOP ( $\delta$ ), KOP ( $\kappa$ ) i MOP ( $\mu$ ) oraz opioidopodobny receptor dla nocycetyliny N/OFQ (ORL1). Zaangażowane są one w mechanizmy odczuwania i modulacji bólu, strachu i przyjemności, uzależnienia fizycznego organizmu, stany depresyjne, wywierają również wpływ na tętno i wartości ciśnienia tętniczego oraz są ważnym czynnikiem regulacji procesów zapalnych (Chadzińska 2007). Najsilniejszy efekt analgetyczny wywołuje aktywacja MOP ( $\mu$ ). Aktywacja poszczególnych podtypów receptorów przynosi odmienne efekty kliniczne - w przypadku DOP mamy do czynienia z działaniem przeciwdepresyjnym, natomiast KOP związany jest z uzależnieniem oraz euforią. Receptory opioidowe najczęściej występują w postaci hetero- i homo-dimerów (Jordan i Devi 1999). Kluczową rolę w wiązaniu ligandów w receptorze MOP pełni pętla zewnątrzkomórkowa I, w przypadku DOP domeny przezbłonowe V, VI i VII, natomiast w KOP domena transbłonowa IV i pętla zewnątrzkomórkowa II (Chaturvedi i in. 2000). Receptory opioidowe występują zarówno w ośrodkowym układzie nerwowy (szczególnie w korze nowej, hipokampie, wzgórzu, prądkowiu, ciele migdałowatym, jądrze pasma samotnego), zakończeniach nerwów czuciowych oraz w tkankach

nieneuronalnych (śródbłonek serca, płuca, mięśnie gładkie, przewód pokarmowy oraz komórki układu immunologicznego - min. limfocyty i makrofagi). (Przewłocki i Przewłocka 2001).

Przekazanie sygnału do wnętrza komórki i aktywacja białka G

Zewnątrzkomórkowa cząsteczka o właściwościach agonistycznych wiąże się z receptorem opioidowym, przez co umożliwia zmianę jego konformacji. Efekt ten jest wywołany modyfikacją przestrzennego oddziaływania między helisami (oddziaływania hydrofobowe, jonowe i wiązania wodorowe). W tym czasie część wewnątrzkomórkowa receptora aktywuje białko G, będące trimerem złożonym z trzech jednostek -  $\alpha$ ,  $\beta$  oraz  $\gamma$ . W wyniku związania agonisty z receptorem następuje zmiana konformacji białka G, fosforylacja difosforanu guanozyny (GDP) do trifosforanu guanozyny (GTP) i dysocjacja trimery na jednostkę  $G_{\alpha}$ -GTP oraz dimer  $G_{\beta\gamma}$ . Podjednostka  $\alpha$  bezpośrednio blokuje cyklazę adenylową i zmniejsza stężenie 3',5'-cyklicznego adenozyνομonofosforanu (cAMP) w komórce, a przez to inicjuje wewnątrzkomórkową kaskadę sygnałową przekaźników wtórnych wpływających na białka efektorowe (Chen i in. 2000). Pobudzenie receptorów opioidowych skutkuje również min. zablokowaniem wewnątrzprostowniczych kanałów potasowych sprzężonych z białkiem G (GIRK) i zamknięciem kanałów jonowych zależnych od wapnia, a przez to zmniejszeniem wewnątrzkomórkowego stężenia  $Ca^{2+}$ , hiperpolaryzacją błony komórkowej, hamowaniem wydzielania substancji P i innych mediatorów bólu. Podjednostka  $\alpha$  wykazuje aktywność GTP-azy, w związku z czym ma zdolność do hydrolizy GTP do GDP oraz reszty fosforanowej oraz ponownego łączenia się w kompleks z podjednostkami  $\beta$  i  $\gamma$  w nieaktywny trimer (Pociecha i in. 2015).

Rola  $\beta$ -arrestyny w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej

Szczególne znaczenie w aktywności receptorów opioidowych posiada beta-arrestyna. Pełni ona bardzo ważną funkcję w procesie desentytyzacji receptorów. W następstwie uruchomienia kaskady sygnowej przez białko G, następuje fosorylacja wewnątrzkomórkowej C-końcowej membrany receptora, a następnie aktywacja beta-arrestyny, która przyłącza się do reszt fosforanowych receptora i uniemożliwia jego wiązanie do kolejnych białek G, chroniąc tym samym przed ich nadmiernym pobudzeniem, a przez to utrzymuje wewnątrzkomórkową homeostazę (Szymiczek i in. 2005). Z badań wynika, że beta-arrestyna jest jednym z tzw. białek szkieletowych (ang. scaffold protein), uczestniczącym w wielu procesach wewnątrzkomórkowych i wpływającym na skuteczność i swoistość sygnałów przekazywanych przez GPCR (Gendron i in. 2015). Badania na myszach pozbawionych genu odpowiedzialnego za produkcję beta-arrestyny, którym podawano przez dłuższy okres czasu morfinę wykazały, że u tych zwierząt w porównaniu z grupą kontrolną znacznie rzadziej występowały działania niepożądane charakterystyczne dla opioidów (w tym depresja oddechowa, zwężenie źrenic, spowolnienie perystaltyki jelit), jednocześnie znacznie wydłużył się u nich okres wytwarzania tolerancji na podawane dawki i uzależnienie (Bohn i in. 2002).

Klasyfikacja ligandów ortosterycznych receptorów opioidowych

Ligand łącząc się z centrum aktywnym receptora opioidowego (ligand ortosteryczny) stabilizuje jedną z jego konformacji, a przez to pobudza bądź blokuje aktywność i zdolność do przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego.

Wśród ligandów ortosterycznych receptorów opioidowych wyróżniamy (Feinberg i in. 1976):

- pełnych agonistów - stabilizują aktywną konformację receptora, posiadają aktywność wewnętrzną, uruchamiają nieselektywnie wszystkie wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe (np. endorfina-1 dla receptora MOP, petydyna, fentanyl, [D-Ala<sup>2</sup>, N-MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol]-enkefalina);
- częściowych agonistów - stabilizują aktywną konformację receptora, ale nie powodują efektu pełnej aktywacji wewnątrzkomórkowej (np. buprenorfina, morfina);
- biased agonistów - wykazują funkcjonalną selektywność, powodują wybiórcze uruchomienie jednego ze szlaków sygnałowych (Stahl i in. 2015);
- odwrotnych agonistów - stabilizują konformację nieaktywną receptora i nie posiadają przy tym aktywności wewnętrznej (np. naltrekson);
- antagonistów - blokują receptor i hamują przekaźnictwo wewnątrzkomórkowe, mają zdolność osłabiania lub znoszenia działania agonistów receptora (np. nalokson).

### Endogenne ligandy receptorów opioidowych

Mianem opioidów określamy substancje wpływające na receptory opioidowe. Należą do nich opiaty naturalnie występujące (min. alkaloidy występujące w opium oraz ich pochodne), pochodne syntetyczne opiatów oraz endogenne peptydy.

W latach 70-tych XX wieku odkryto naturalne ligandy receptorów opioidowych, znajdujące się w ludzkim organizmie. Są nimi peptydy posiadające na N-końcu łańcucha sekwencję aminokwasową Tyr-Gly-Gly-Phe lub Tyr-PRO-Phe/Trp-Phe, nazywaną motywem opioidowym (Ling i in. 1976). Pozostała część łańcuchów polipeptydowych jest specyficzna dla każdego z ligandów i odpowiada za ich selektywność oddziaływania z danym typem receptora opioidowego. Wśród opioidów endogennych wyróżniamy: 1) endorfiny - najsilniej pobudzają receptor MOP oraz DOP, występują głównie w przedniej i środkowej części przysadki mózgowej, jądrze łukowatym podwzgórza oraz jądrze pasma samotnego rdzenia, 2) enkefaliny - wykazują najwyższe powinowactwo do receptora DOP, w mniejszym stopniu do MOP, obecne są min. w międzymózgowiu, moście, mózdzku, hipokampie i śródmózgowiu oraz 3) dynorfiny - aktywne wobec KOP, w mniejszym stopniu wobec DOP, MOP oraz receptora NMDA, występują w ciele migdałowatym, rdzeniu kręgowym, śródmózgowiu, prążkowie oraz przysadce mózgowej. Wymienione peptydy są produkowane zarówno w obrębie centralnego układu nerwowego jak i w układzie pokarmowym, endokrynnym i immunologicznym. Nocyceptyna jest agonistą receptora N/OFQ i występuje głównie we włóknach nerwowych rdzenia kręgowego, jądrze podwzgórzowym, ciele migdałowatym oraz jądrze nerwu trójdzielnego. Endogenne peptydy opioidowe nie odznaczają się selektywnością, wykazują natomiast mniejsze lub większe powinowactwo do wszystkich typów receptorów opioidowych, a ostateczny efekt ich działania jest wypadkową efektów wywołanych pobudzeniem różnych typów receptorów (Krajnik, Zylicz 2013).

### Klasyfikacja allosterycznych ligandów receptorów

Modulatory allosteryczne to związki małowcząsteczkowe, które nie wiążą się bezpośrednio z centrum aktywnym receptora, lecz z jego centrum allosterycznym. W taki sposób wpływają one na powinowactwo i skuteczność wiązania ligandów ortosterycznych. Wyróżniamy trzy typy modulatorów allosterycznych (Burford i in 2015):

- PAM /pozytywne modulatory allosteryczne/ - stabilizują jedną z aktywnych konformacji receptora, ułatwiają i/lub wzmacniają wiązanie liganda ortosterycznego;
- NAM /negatywne modulatory allosteryczne/ - stabilizują jedną z nieaktywnych konformacji receptora, utrudniają wiązanie liganda ortosterycznego;
- SAM /nazywane cichymi lub neutralnymi allosterycznymi modulatorami/ - nie stabilizują konformacji receptora, ale blokują dostęp do centrum allosterycznego dla NAM i PAM.

Modulatory allosteryczne łączą się z receptorem w innym miejscu niż ligandy ortosteryczne, a przez to stabilizują konformację aktywną bądź nieaktywną receptora. Modulatory nie wykazują zdolności aktywacji szlaków wewnątrzkomórkowych, tylko działają pośrednio poprzez zmianę konformacji receptora, a przez to wpływają na powinowactwo i efektywność działania liganda ortosterycznego. Modulatory allosteryczne wykazują cechy, dzięki którym mogą być bardziej skuteczne i bezpieczne w terapii bólu niż klasyczne opiaty. Różnorodność typów i podtypów receptorów opioidowych sprawia, że niezwykle trudno jest otrzymać wysoce selektywny ligand. Wykorzystanie centrum allosterycznego jako miejsca docelowego działania leku umożliwi uzyskanie większej specyficzności receptorowej, a przez to selektywności działania. Niezwykle istotnym z punktu widzenia projektowania nowych leków jest to, aby modulatory allosteryczne były substancjami małowcząsteczkowymi, a dzięki temu będą się odznaczały lepszymi parametrami farmakokinetycznymi, takimi jak uwalnianie i absorpcja leku, dystrybucja w organizmie, metabolizm oraz eliminacja (LADME). Bowiem klasyczne opiaty są substancjami wielkocząsteczkowymi i zwykle problemem jest dostarczenie leku do miejsca jego docelowego działania (Thompson i Kelly 2015).

#### 4. Podsumowanie

Klasyczne leki opioidowe stanowią istotny oręż do walki z bólem, jednak ich nasilone działania uboczne ograniczają wykorzystanie głównie do tych sytuacji klinicznych, w których niesteroidowe leki przeciwzapalne (NSLP) są niewystarczające w uśmierzeniu bólu. Najnowsze odkrycia ostatnich lat związane z mechanizmem działania receptorów opioidowych oraz wpływem ich agonistów i modulatorów, dają jednak nadzieje na otrzymanie nowych leków przeciwbólowych, które będą charakteryzowały się większą selektywnością działania, a przez to lepszym profilem klinicznym. Dotychczas głównym problemem w modelowaniu ligandów receptorów opioidowych była zbliżona struktura centrów aktywnych poszczególnych podtypów tego receptora. Podobieństwo sekwencyjne aminokwasów wynosi odpowiednio: dla DOR i KOR 61%, dla MOR i KOR 57%, dla MOR i DOR 62%. Ominięciem tego problemu mogą okazać się pozytywne modulatory allosteryczne (PAM), które są wysoce selektywne względem poszczególnych podtypów receptora. Związki te stabilizują konformację aktywną receptorów opioidowych i ułatwiają związanie ligandów ortosterycznych, a przez to zwiększają ich powinowactwo i/lub siłę działania. Ich dodatkowe atuty, takie możliwość modulacji receptorowej z wykorzystaniem endogennych ligandów oraz brak ryzyka przedawkowania sprawiają, że PAM znajdują się w centrum zainteresowań badaczy na całym świecie i stanowią wyróżniającą się opcję terapeutyczną w zwalczaniu bólu.

#### 5. Literatura

- Bernstein RR, Dillon PF (2014) A common molecular motif characterizes extracellular allosteric enhancers of GPCR aminergic receptors and suggests enhancer mechanism of action. *Current Medical Chemistry* 21(32): 3673-3686.
- Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG (2002) Differential Mechanisms of Morphine Antinociceptive Tolerance Revealed in  $\beta$ Arrestin-2 Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience* 22(23): 10494-10500.
- Burford NT, Traynor JR, Alt A (2015) Positive allosteric modulators of the  $\mu$ -opioid receptor: a novel approach for future pain medications. *British Journal of Pharmacology* 172: 277-286.
- Chadzińska M (2007) Układ Opioidowy A Odporność Wrodzona - Badania Porównawcze I. Opioidy i Receptory Opioidowe. *Postępy Biologii Komórki* 34(2): 251-2625.
- Chen X, Marrero HG, Murphy R, Lin YJ, Freedman JE 2000 Altered gating of opiate receptor-modulated K<sup>+</sup> channels on amygdala neurons of morphine-dependent rats. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 97(26): 14692-14696.
- Chaturvedi K, Christoffers KH, Singh K, Howells RD (2000) Structure and regulation of opioid receptors. *Biopolymers*. 55(4): 334-346.
- Feinberg AP, Creese I, Snyder SH (1976) The opiate receptor: A model explaining structure-activity relationships of opiate agonists and antagonists. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 73(11): 4215-4219.
- Gendron L, Mittal N, Beaundry H, et. all (2015) Recent advances on the opioid receptor: from trafficking to function. *British Journal of Pharmacology* 172(2): 403-419.
- Jordan BA, Devi LA (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399(6737): 697-700.
- Kostowski W, Herman ZS (2013) *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL 2:194-226.
- Krajnik M, Żylicz Z (2013) Mechanizmy działania przeciwbólowego opioidów. *Polska Medycyna Paliatywna* 2: 111-118.
- Law PY, Reggio PH, Loh HH (2013) Opioids Receptors: Toward separation of analgesic from undesirable effects. *Trends in Biochemical Science* 38(6): 275-282.
- Ling N, Burgus R, Guillemin R (1976) Isolation, primary structure and synthesis of alpha-endorphin and gamma-endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysal origin with morphinomimetic activity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 73(11): 3942-3946.

- Pociecha K, Przejczkowska-Pomierny K, Cios A i in. (2015) Współczesne koncepcje w badaniach nad cyklicznym AMP i jego rolą w reakcji zapalnej. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 69: 777-798.
- Przewłocki R, Przewłocka B (2001) Opioids in chronic pain. *European Journal of Pharmacology* 429(3): 79-91.
- Stahl EL, Zhou L, Ehlert FJ, Bohn LM (2015) A novel method for analyzing extremely biased agonism at G protein-coupled receptors. *Molecular Pharmacology* 87: 866-877.
- Szymiczek M, Kurowska E, Gorczyca WA (2005) Rola arestyn w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 59: 324-333.
- Thompson GL, Kelly E (2015) Christopoulos, A et. all Novel GPCR paradigms at the  $\mu$ -opioid receptor. *British Journal of Pharmacology* 172: 287-296.
- Tölle TR (2016) European Pain Federation EFIC position on the debate on “pain as a disease in its own right”. *Societal Impact of Pain* 54-56.
- Wang L, Martin B, Brennehan R et al. (2009) Allosteric Modulators of G Protein-Coupled Receptor: Future Therapeutics for Complex Physiological Disorders. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 331(2): 340-348.

## **4. Modulatory allosteryczne receptorów opioidowych**

Allosteric modulators of opioid receptors

Straszak Dominik<sup>(1)</sup>, Drózd Monika<sup>(2)</sup>, Aleksandra Dymek<sup>(3)</sup>, Gabriela Widelska<sup>(3)</sup>,  
Mateusz Tabin<sup>(4)</sup>, Mateusz Zborowski<sup>(5)</sup>, Dariusz Matosiuk<sup>(5)</sup>

<sup>(1)</sup>Katedra i Zakład Syntezy i Technologii Chemicznej Środków Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

<sup>(2)</sup>Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

<sup>(3)</sup>Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

<sup>(4)</sup>Oddział Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Metabolicznych 4 Wojskowego Szpitala Klinicznego z Polikliniką we Wrocławiu

<sup>(5)</sup>Klinika Położnictwa, Chorób Kobiety i Ginekologii Onkologicznej Centralnego Szpitala Klinicznego MSWiA w Warszawie

Opiekun naukowy: prof. hab. n. farm. Dariusz Matosiuk

Dominik Straszak: dominik.straszak@gmail.com

Słowa klucze: PAM, MOP, ignawina

Receptory opioidowe stanowią terapeutyczny cel działania leków przeciwbólowych. Należą one do siedmiomembranowych białek rodziny GPCR. W ośrodkowym układzie nerwowym wyróżniamy trzy typy tych receptorów: MOP, DOP i KOP. Charakteryzuje je duże podobieństwo strukturalne- wspólna w 60% sekwencja aminokwasowa szczególnie w obrębie ortosterycznego centrum aktywnego. Powoduje to niezwykle trudności w uzyskaniu selektywnych ligandów, specyficznych dla danego typu receptora. Dlatego też trwają nieustanne poszukiwania nowych metod aktywacji MOP oraz DOP. Obecnie ogromnym zainteresowaniem cieszą się związki, które aktywują receptor opioidowy wiążąc się z jego centrum allosterycznym, które w przeciwieństwie do centrum ortosterycznego wykazuje duże zróżnicowanie strukturalne w obrębie poszczególnych typów a nawet podtypów receptorów. Ostatnie lata przyniosły nowe odkrycia w tej dziedzinie, otrzymano szereg podtypów będących pozytywnymi modulatorami allosterycznymi dla DOP, MOP i KOP. Ich mechanizm działania opiera się na stabilizacji jednej z aktywnych konformacji, ułatwiając w ten sposób wiązanie liganda ortosterycznego oraz wzmacniając siłę jego działania. Odkrycia te otwierają drogę dla otrzymania związków wysoce selektywnych w działaniu, jednocześnie pozbawionych działań niepożądanych, którymi obciążone są klasyczne leki opioidowe.

### **1. Wstęp**

Modulatory allosteryczne receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR's) mogą stanowić alternatywę dla klasycznych agonistów i antagonistów wiążących się z centrum ortosterycznym. Wykazują one większą specyficzność receptorową, brak ryzyka przedawkowania czy możliwość wybiórczej aktywacji jednej z wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych. Pierwsze poznane modulatory receptorów opioidowych to występujące naturalnie salwinoryna A, tetrahydrokannabinol (THC) oraz kannabidiol. Wykazują one negatywny wpływ modulujący (NAM), osłabiają wiązanie agonisty z centrum aktywnym. Jednak w przypadku receptorów opioidowych szczególne znaczenie farmakologiczne mają pozytywne modulatory allosteryczne (PAM's). W ostatnich latach odkryto pierwsze związki o udowodnionej aktywności PAM dla MOP oraz DOP, mogą one w niedalekiej przyszłości stanowić alternatywę dla obecnie stosowanych leków przeciwbólowych oraz przeciwdepresyjnych (Wang i in. 2009).

### **2. Opis zagadnienia**

Receptory opioidowe ze względu na swoje ogromne znaczenie kliniczne są jednymi z najlepiej poznanych białek rodziny GPCR. W latach 90-tych XX wieku otrzymano i przebadano

struktury MOP, DOP, KOP oraz NOP. Wszystkie z wymienionych typów receptorów mają 60% wspólnej sekwencji aminokwasowej. Ich szlak sygnalizacji wewnątrzkomórkowej odbywa się za pośrednictwem białka G z następczą inhibicją cykazy adenylowej, modulacją pracy kanałów jonowych oraz wpływem na transkrypcję białek. Istnieje także druga ścieżka sygnałowa, która jest niezależna od białka G, a wiąże się z aktywacją  $\beta$ -arestyny. Modulatory allosteryczne stabilizują jedną z konformacji receptora opioidowego poprzez wiązanie się z jego centrum allosterycznym. Pozytywne modulatory, czyli PAM, zwiększają powinowactwo i/lub skuteczność działania agonisty. Ich zastosowanie pozwoli na ograniczenie dawek klasycznych opiatów wykorzystywanych w leczeniu bólu lub wręcz zrezygnowanie z ich stosowania wzmacniając działanie endogennych peptydów opioidowych (Feinberg i in. 1976)

### 3. Przegląd literaturowy

Testy in vitro najczęściej wykorzystywane w badaniu aktywności PAM

Aby określić czy dany związek wykazuje zdolność modulacji allosterycznej receptora niezbędne jest wykonanie testów in vitro. Koniecznie należy wyznaczyć stopień powinowactwa do centrum ortosterycznego oraz wpływ na stężenie cAMP, arestyny oraz białka G w komórce w obecności znakowanych ligandów. PAM receptorów opioidowych powinny wzmacniać aktywacje białka G przez agonistę ortosterycznego przy zachowaniu jak najniższego stopnia pobudzenia arestyny (Luttrell 2014).

Pomiar powinowactwa do centrum ortosterycznego

W tym celu stosuje się test saturacyjnego wiązania ligandów z wykorzystaniem radioligandów (najczęściej [ $^3$ H]DAMGO, [ $^3$ H]diprenorfiny, [ $^3$ H] naloksonu). W trakcie badania oznacza się  $EC_{50}$  w obecności modulatora i porównuje uzyskane wyniki z wartościami otrzymanymi dla znanych agonistów receptora (Matosiuk i in. 2002).

Pomiar poziomu aktywacji białka G

W badaniu oznacza się zmianę aktywności białka G pobudzonego ortosterycznym agonistą (najczęściej DAMGO) w obecności związku badanego z wykorzystaniem znakowanego [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S. Im silniejsza aktywacja białka G tym silniejszy efekt przeciwbólowy (MOP, DOP) oraz przeciwdepresyjny (DOP) (Rivero i in. 2012).

Test akumulacji cAMP pobudzonego forskoliną

Aktywacja receptorów opioidowych wywołuje inhibicję cykazy adenylowej i spadek wytwarzania cyklicznego adenozylo-3',5'-monofosforanu (cAMP). Efektorami cAMP są między innymi białka Epac, kinaza proteinowa A (PKA), kanały jonowe. PAM powinien zwiększyć siłę blokowania enzymu i obniżyć akumulację cAMP przez ortosterycznego agonistę. Pomiaru dokonuje z wykorzystaniem HPLC z detekcją UV lub fluorymetryczną, metodami radioimmunologicznymi (RIA) bądź immunoenzymatycznymi (EIA/Elisa) (Pociecha i in. 2015).

Pomiar siły aktywacji  $\beta$ -arestyny

Ligandy ortosteryczne receptorów opioidowych obok pobudzenia białka G powodują również aktywację arestyny. Bierze ona udział w desentytyzacji receptora utrzymując homeostazę komórki, równocześnie odpowiada za wiele ciężkich objawów niepożądanych opiatów. Agoniści w obecności PAM powinni w jak najmniejszym stopniu pobudzać ścieżkę aktywacji arestyny. Najczęściej w badaniach wykorzystuje się techniki fluorometryczne oraz bioluminescencyjne: FRET i BRET (Lohse i in. 2012).

Farmakofor ligandów receptorów opioidowych

Klasyczny trójpunktowy model farmakoforu dla receptorów opioidowych zakłada obecność: pierścienia aromatycznego, regionu hydrofobowego oraz trzeciorzędowego atomu azotu, który tworzy bardzo silne wiązanie jonowe z kwasem asparaginowym w pozycji 3.32 receptora, zakotwicząc ligand w centrum aktywnym. Równie istotna dla działania przeciwbólowego jest obecność dwuwęglowego fragmentu w strukturze. Większość znanych opioidów takich jak morfina, fentanyl czy nalokson spełnia te warunki (Kaczor i Matosiuk 2002). Odkrycie nowych związków nie posiadających protonowalnego azotu o znacznym powinowactwie do receptora opioidowego

doprowadziły do stworzenia nowego nieklasycznego farmakoforu składającego się z bazy hydrofobowej i części aromatycznej lub akceptora wiązań wodorowych, grupy aromatycznej oraz elementu hydrofobowego (Szacoń i in. 2015).

#### Kationy endogenne o działaniu modulującym na receptory GPCR

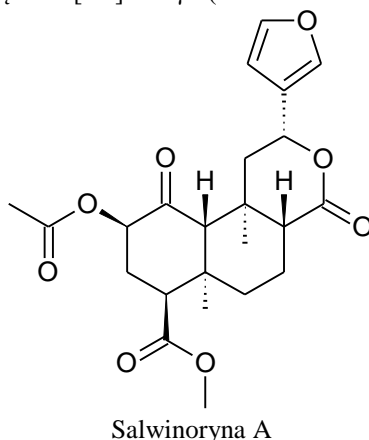
Od wielu lat jony sodu znane są z negatywnej modulacji receptorów rodziny GPCR w tym receptorów opioidowych, adrenergicznych czy dopaminergicznych. Ich obecność obniża powinowactwo agonistów ortosterycznych jednocześnie nie wywierając wpływu na działanie antagonistów. Badania na wyizolowanych komórkach mózgowych myszy potwierdziły aktywność NAM jonów sodu. Mechanizm działania związany jest najprawdopodobniej z wpływem na przepływ strumienia wody wewnątrz domeny 7TM. Kieszkań allosteryczna dla jonów sodu znajduje się w pobliżu kwasu asparaginowego usytuowanego w pozycji 2.50, co potwierdzone zostało strukturami krystalograficznymi. Kationy sodowe wpływają na aktywność i powinowactwo ligandów oraz selektywność aktywacji ścieżki arestyny. Modulujące działanie na receptory GPCR wykazują również jony cynku oraz magnezu (Bartuzi i in. 2016).

#### Modulatory allosteryczne receptorów MOP

Głównym celem terapeutycznym obecnie stosowanych opiatów w leczeniu zarówno bólu ostrego jak i chronicznego jest receptor MOP. Jego pobudzenie powoduje silny efekt analgetyczny (Thompson i in. 2014). Klasyczne leki opioidowe takie jak morfina, fentanyl czy oksykodon wywołują niebezpieczne działania niepożądane związane z aktywacją receptora MOP takie jak depresja oddychania, zmiany w regulacji temperatury ciała, euforię, sedację, katalepsję, wzrost spożycia pokarmów, aktywności ruchowej, bradykardię, uzależnienie, spadek perystaltyki jelit, zwężenie źrenic oraz efekty endokrynologiczne takie jak wzrost stężenia hormonu wzrostu i prolaktyny. Dlatego konieczne jest poszukiwanie nowych leków, bardziej selektywnych w sposobie działania (Law i in. 2013)

#### Salwinoryna A

Salwinoryna A to pierwszy znany modulator allosteryczny receptora MOP (Rys. 1). Jest to związek z grupy diterpenoidów wyizolowany z rośliny *Salvia divinorum*, znanej z bardzo silnych właściwości psychodelicznych. Salwinoryna A jest ortosterycznym agonistą receptora opioidowego KOP i jednocześnie negatywnym modulatorem allosterycznym MOP (NAM). Utrudniając związanie agonisty z centrum aktywnym obniżają min. wartości  $EC_{50}$  i  $E_{MAX}$  (Bartuzi i in. 2015). Właściwości te zostały potwierdzone *in vitro* w kinetycznych testach radioreceptorowych względem receptorów opioidowych z użyciem [ $^3H$ ]DAMGO jak również testach funkcjonalnych: akumulacji cAMP pobudzonego forskoliną oraz wiązania [ $^{35}S$ ]GTP $\gamma$ S (Rothman i in. 2007).



**Rys. 1.** Budowa salwinoriny A

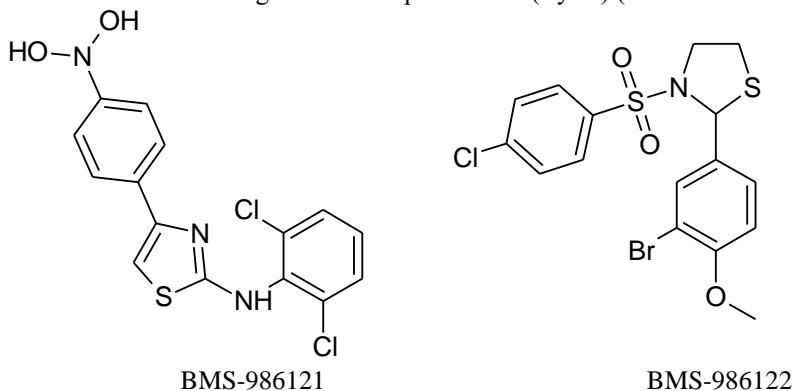


### Kannabidiol i tetrahydrokannabinol

Podobnie jak salwinoryna A są negatywnymi modulatorami allosterycznymi receptorów opioidowych. Jednak ich siła działa jest znacznie niższa. Kannabidiol przyspiesza kilkunastokrotne dysocjacje DAMGO z centrum aktywnego. Stężenie niezbędne do osiągnięcia takiego efektu wynosi około 100 $\mu$ M. Podobna struktura i lipofilowość salwinoryny A, kannabidiolu oraz tetrahydrokannabinolu pozwala przypuszczać, że mechanizm ich działania jest zbliżony lub wręcz identyczny (Kathmann i in. 2006).

### BMS-986121 i BMS-986122

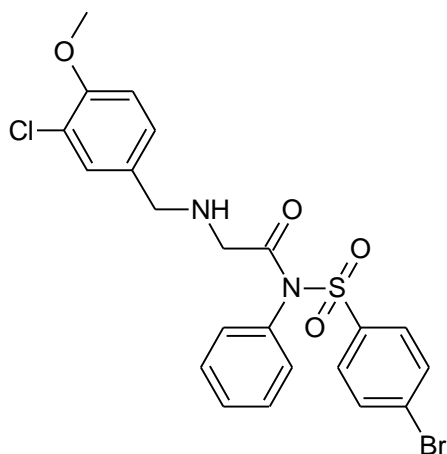
W wyniku wysokowydajnych badań przesiewowych (HTS) Burford otrzymał dwa PAM receptora MOP oraz dwa SAM receptora DOP. BMS-986121 oraz BMS-986122 w testach in vitro zwiększały efekt działania selektywnego ortosterycznego agonisty- endomorfiny-1. Oba związki same nie wykazały zdolności do rekrutacji arestyny, ale w ich obecności nastąpiło jej wzmocnienie przez endomorfine-1. W testach saturacyjnego wiązania ligandów z wykorzystaniem neutralnego antagonisty - [ $H^3$ ]diprenorfiny, w obecności BMS-986121 oraz BMS-986122 endomorfina-1, DAMGO ([D-Ala<sup>2</sup>, N-Phe<sup>4</sup>, Gly-ol]-enkefalina) oraz morfina wykazały znacznie silniejsze powinowactwo do receptora MOP, wypierając z centrum aktywnego znakowaną diprenorfinę. Kolejnym etapem było wykonanie testów funkcjonalnych wpływu modulującego potencjalnych PAM z wykorzystaniem min. testu aktywacji szlaku  $\beta$ -arestynowego, siły aktywacji białka G za pomocą testu wiązania [ $^{35}S$ ]GTP $\gamma$ S oraz testu akumulacji cAMP pobudzonego forskoliną. Tu również wyżej wymienione związki zwiększyły aktywność klasycznych agonistów receptora MOP. Obliczony współczynnik kooperacyjny  $\alpha$ , w obu przypadkach wyniósł ok 7. BMS-986121 i BMS-986122 wykazały pewne działanie ortosteryczne agonistyczne jednak jedynie przy dużych stężeniach. Konkludując badania wykazały, że w obecności nowoodkrytych PAM znacznie wzrosła maksymalna odpowiedź komórkowa na działanie agonistów receptora MOP (Rys.2) (Burford i in. 2013).



**Rys. 2.** Struktura BMS-986121 oraz BMS-986122.

### MS1

Rok później w wyniku poszukiwania analogów chemicznych BMS-986121 i BMS-986122 w bazie eMolecules otrzymano szereg związków wykazujących aktywność PAM i SAM wobec receptorów MOP. MS1 wykazał najwyższą siłę modulacji działania endomorfiny-1 (Rys.3). W teście aktywacji szlaku arestynowego oraz w teście saturacyjnego wiązania ligandów receptorów z wykorzystaniem [ $H^3$ ]diprenorfiny zwiększył on 7-krotne powinowactwo L-metadonu, jednocześnie nie zmieniając powinowactwa morfiny, endomorfiny-1 ani DAMGO do MOP. Natomiast w badaniu wiązania [ $^{35}S$ ] GTP $\gamma$  4-krotnie wzmocnił siłę działania L-metadonu. MS1 nie wykazał wpływu na siłę aktywacji DAMGO i endomorfiny-1 ( Burford i in. 2015).



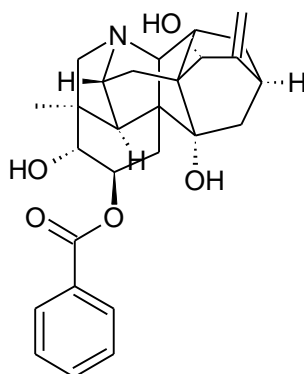
MS1

Rys. 3. Struktura MS1.

Na podstawie otrzymanego szeregu związków opracowano model farmakoforowy PAM i SAM receptora MOP. Zawiera on w swojej strukturze dwa atomy będące akceptorami wiązania wodorowego, hydrofobową grupę bądź podstawnik halogenowy oraz 3 pierścienie aromatyczne (Bisignano i in. 2015).

#### IGNAVINE

Jest alkaloidem występującym w *Aconitum*. Ignawina wykazuje specyficzne właściwości farmakologiczne. Z jednej strony stanowi ligand ortosteryczny receptora  $\mu$  wywołując analgezję u zwierząt laboratoryjnych, z drugiej stabilizuje aktywny stan konformacyjny MOP ułatwiając wiązanie agonisty. Ze względu na to, że receptory opioidowe występują najczęściej w postaci dimerów efekt działania zależy od ilości użytej substancji. Badania *in vitro* w testach saturacyjnych z wykorzystaniem DAMGO potwierdziły, że przy niższych stężeniach (ok.  $1\mu\text{M}$ ) ignawina zwiększa powinowactwo i siłę wiązania drugiego ligandu z MOP, natomiast przy wyższych stężeniach (powyżej  $10\mu\text{M}$ ) sama zajmuje centra aktywne obu receptorów tworząc dimer blokując dostęp DAMGO (Rys.4) (Ohnuchi i in. 2016).



Ignawina

Rys. 4. Struktura ignawiny.

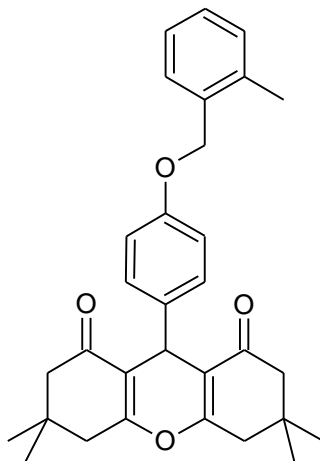
#### Modulatory allosteryczne DOP

Receptor DOP może stanowić potężny oręż w walce z przewlekłym bólem, jego aktywacja prowadzi do silnej analgezji, poza tym w przeciwieństwie do MOP nie występuje efekt tolerancji podczas długiego stosowania. Aktywacja DOP zmniejsza również negatywne emocje często

towarzyszące chorobom psychicznym. Stąd prace nad zastosowaniem agonistów tego receptora w leczeniu depresji, niepokoju oraz lęku. Kolejnym udokumentowanym efektem pobudzenia DOP jest działanie neuroprotektoryjne, co może być w przyszłości wykorzystane w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych takich jak Alzheimer czy Parkinson (Nozaki i in. 2014).

#### BMS-986187

W wyniku wysokowydajnych badań przesiewowych (HTS) otrzymano serię 15-tu potencjalnych modulatorów allosterycznych DOP. Wśród nich najwyższą siłą modulującą oraz selektywność receptorową wykazał BMS-986187 (Rys.5). W testach *in vitro* wzmacniał on efekt działania selektywnego ortosterycznego agonisty DOP- leu-enkefalinę. Związek samodzielnie posiada jedynie minimalną zdolności do rekrutacji arestyny, ale w jego obecności nastąpił 18-krotny wzrost siły aktywacji szlaku arestynowego przez leu-enkefalinę. Nowy modulator poddano badaniom receptorowym. W testach saturacyjnego wiązania ligandów z wykorzystaniem neutralnego antagonisty - [ $H^3$ ]diprenorfiny, w obecności BMS-98618 pełni agoniści DOP (leu-enkefalina oraz SNC80) wykazały znacznie silniejsze powinowactwo do receptora, wypierając z centrum aktywnego znakowaną diprenorfinę, natomiast w przypadku częściowego agonisty- TAN67 wpływ modulatora na wiązanie był znacznie słabszy. Kolejnym etapem było wykonanie badań funkcjonalnych z wykorzystaniem min. testu aktywacji szlaku arestynowego, siły aktywacji białka G za pomocą testu wiązania [ $^{35}S$ ]GTP $\gamma$ S oraz testu akumulacji cAMP pobudzonego forskoliną. Tu również BMS-98618 wzmacnił działanie klasycznych agonistów receptora DOP. Konkludując badania *in vitro* udowodniły, że w obecności nowoodkrytego PAM znacznie wzrosła maksymalna odpowiedź komórkowa na działanie agonistów receptora DOP, sam związek wykazał pewne minimalne działanie ortosteryczne jednak jedynie przy bardzo dużych stężeniach (Burford i in. 2015).



**Rys. 5.** Struktura BMS-986187

#### 4. Podsumowanie

Pozytywne modulatory allosteryczne łączą się z centrum allosterycznym receptora opioidowego i stabilizują jedną z jego konformacji aktywnych, ułatwiając wiązanie ligandów ortosterycznych, zwiększając ich powinowactwo i/ lub siłę działania. Same nie mają zdolności do aktywacji szlaków wewnątrzkomórkowych. Zastosowanie PAM pozwoli na ograniczenie dawek klasycznych opiatów wykorzystywanych w leczeniu bólu lub wręcz zrezygnowania z ich stosowania wzmacniając działanie endogennych peptydów. Pozwola również uzyskać większą selektywność receptorową oraz ograniczenie działań niepożądanych.

#### 5. Literatura

Bartuzi D, Kaczor AA, Matosiuk D (2015) Activation and allosteric modulation of human  $\mu$ Opioid receptor in molecular dynamics. *Chemical Information and Modeling* 55: 2421-2434.

Bartuzi D, Kaczor AA, Matosiuk D (2016) Interplay between two allosteric Sites and Their influence on agonist binding in human  $\mu$ Opioid receptor. *Chemical Information and Modeling* 56: 563-570.

Burford NT, Livingston KE, Canals M et al. (2015) Discovery, synthesis, and molecular pharmacology of selective positive allosteric modulators of the  $\delta$ -opioid receptor. *Journal of Medical Chemistry* 58: 4220-4229.

Burford NT, Clark MJ, Wehrman TS et. all. (2013) Discovery of positive allosteric modulators and silent allosteric modulators of the  $\mu$ -opioid receptor. *Proceedings of the National Academy of Science* 110(26): 10830-10835.

Burford NT, Traynor JR, Alt A (2015) Positive allosteric modulators of the  $\mu$ -opioid receptor: a novel approach for future pain medications. *British Journal of Pharmacology* 172: 277-286.

Bisignano P, Burford NT, Shang Y et. all (2015) Ligand-based discovery of a New Scaffold for allosteric modulation of the  $\mu$ -opioid receptor. *Journal of Chemical Information and Modelling* 55(9): 1836-1843.

Feinberg AP, Creese I, Snyder SH (1976) The opiate receptor: a model explaining structure-activity relationships of opiate agonists and antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73: 4215-4219.

Kaathmann M, Flau K, Redmer A et al. (2006) Cannabidiol is an allosteric modulator at  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 372: 354-361.

Kaczor AA, Matosiuk D (2002) Non-peptide opioid receptor ligands. Recent advances. Part 1 Agonists. *Current Medical Chemistry* 9: 1567-1589.

Law PY, Reggio PH, Loh HH (2013) Opioid receptors: Toward separation of analgesic from undesirable effects trends. *Trend in Biochemical Sciences* 38(6): 275-282.

Lohse MJ, Nuber S, Hoffmann C (2012) Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling *Pharmacological Reviews* 64: 299-336.

Luttrell LM (2014) More than just a hammer: ligand "bias" and pharmaceutical discovery. *The Endocrine Society* 28(3): 281-294.

Matosiuk D, Fidecka S, Antkiewicz-Michaluk L i in. (2002) Synthesis and pharmacological activity of new carbonyl derivatives of 1-aryl-2-imidazolidine. Part 3. Synthesis and pharmacological activity of 1-aryl-5,6(1H)dioxo-2,3-dihydroimidazo[1,2-a]imidazoles. *European Journal of Medical Chemistry* 36: 783-797.

Nozaki C, Nagase H, Nemoto T et al. (2014) In vivo properties of KNT-127, a novel  $\delta$  opioid receptor agonist: receptor internalization, antihyperalgesia and antidepressant effects in mice. *British Journal of Pharmacology* 171: 5376-5386.

Ohbuchi, K.; Miyagi, C.; Suzuki Y et all. (2016) Ignavine: a novel allosteric modulator of the  $\mu$  opioid receptor. *Scientific Reports* 31748(6): 1-12.

Pociecha K, Przejczkowska-Pomierny K, Cios A i in. (2015) Współczesne koncepcje w badaniach nad cyklicznym AMP i jego rolą w reakcji zapalnej. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 69: 777-798.

Rivero G, Llorente J, McPherson J et all. (2012) Endomorphin-2: a biased agonist at the  $\mu$ -opioid receptor. *Molecular Pharmacology* 82: 178-188.

Rothman RB, Murphy DL, Xu H et. all (2007) Salvinorin A: Allosteric interactions at the  $\mu$ -opioid receptor. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320(2): 801-810.

Thompson GI, Kelly E, Christopoulos A et all. (2014) Novel GPCR paradigms at the  $\mu$ -opioid receptor. *British Journal of Pharmacology* 172: 287-296.

Szacón E, Rządowska M, Kaczor AA i in. (2015) Synthesis, central nervous system activity and structure-activity relationships of novel 1-(1-alkyl-4-aryl-4,5-dihydro-1H-imidazo)-3-substituted urea derivatives. *Molecules* 20: 3821-3840.

Wang L, Martin B, Breneman R et all. (2009) Allosteric Modulators of G protein-coupled receptor: future therapeutics for complex physiological disorders. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 331(2): 340-348.

## 5. Biomechanika komórki i cytoszkielet

Cell biomechanics and the cytoskeleton

Szydlak Renata, Trojan Sonia

Katedra Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Piotr Laidler

Renata Szydlak: renata.szydlak@uj.edu.pl

Słowa kluczowe: filamenty aktynowe, mikrotubule, filamenty pośrednie, mikroskop sił atomowych (AFM)

### Streszczenie

Zdolność komórek eukariotycznych do przeciwstawiania się deformacji, transport wewnątrzkomórkowy i zmiana kształtu podczas ruchu komórki zależą od cytoszkieletu, wzajemnie połączonej sieci włókien ciągłych i biopolimerów. Niniejsza praca ma na celu przybliżyć czytelnikowi związek pomiędzy strukturą i funkcją cytoszkieletu, zarówno na poziomie tworzących go białek, jak i tworzonych przez nie struktur. Ostatni rozdział poświęcono na omówienie technik umożliwiających badanie właściwości cytoszkieletu, w szczególności skupiając się na obecnie najbardziej popularnej metodzie – mikroskopii sił atomowych AFM.

### 1. Wstęp

Mechaniczne właściwości środowiska, w którym znajdują się komórki, takie jak stres mechaniczny, jego sztywność i geometria odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu i wpływają na los komórki. Mechanika środowiska wpływa nie tylko na kształt i orientację komórek, ale także reguluje proliferację i różnicowanie komórek oraz decyduje o rozwoju i organizacji tkanek. Zdolność komórek do zachowania swojej integralności w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne, w tym na stres mechaniczny oraz zmian kształtu podczas przemieszczania się jest możliwa dzięki cytoszkieletowi, strukturze utworzonej przez wzajemnie powiązaną sieć zbudowaną z białek filamentowych oraz regulatorowych.

Cytoszkielet pełni w komórkach trzy zasadnicze funkcje: (i) przestrzennie organizuje zawartość komórki; (ii) fizycznie i biochemicznie „łączy” komórki z ich środowiskiem zewnętrznym; *in vivo* z sąsiednimi komórkami lub płynami ustrojowymi, a *in vitro* w hodowlach – z podłożem hodowlanym i sąsiednimi komórkami; oraz (iii) generuje w sposób skoordynowany w czasie i przestrzeni siły i naprężenia, które umożliwiają komórkom przemieszczanie się oraz zmianę kształtu w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne i wewnętrzne. Cytoszkielet wbrew swojej nazwie nie jest strukturą statyczną, ale złożonym i bardzo dynamicznym układem, zmieniającym swoją organizację w zależności od warunków, w jakich komórka się w danej chwili znajduje. Możliwość dynamicznej przebudowy elementów cytoszkieletu jest niezbędna dla prawidłowego funkcjonowania komórki, a zaburzenia tego procesu przez czynniki stabilizujące jego składowe (np. taksoł, falloidyne czy mykotoksynę) prowadzą do śmierci komórki, a w konsekwencji mogą prowadzić do śmierci całego organizmu.

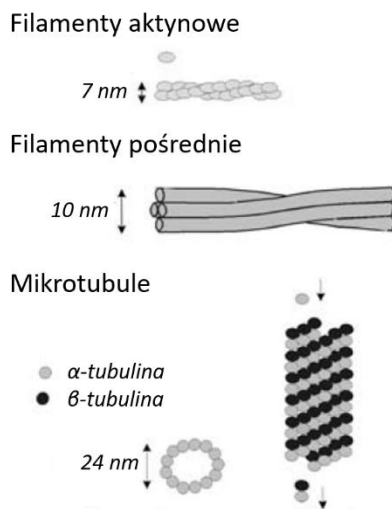
Teza, że cytoszkielet i jego właściwości mechaniczne mogą odgrywać ważną rolę w regulacji cyklu komórkowego, powstawaniu tkanek, czy rozwoju całych organizmów została sformułowana przez Donalda Ingbera w 1985 roku (Ingber i Jamieson 1985) i od tamtego czasu znajdujemy coraz więcej przesłanek potwierdzających jej słuszność (Zemel i Safran 2010). W niniejszej pracy omówione zostały związki pomiędzy strukturą i funkcją cytoszkieletu, zarówno na poziomie tworzących go białek, jak i tworzonych przez nie struktur.

### 2. Przegląd literatury

#### 2.1 Struktura cytoszkieletu

Cytoszkielet zbudowany jest z dynamicznej sieci utworzonej z trzech podstawowych elementów: włókien aktynowych, mikrotubul i filamentów pośrednich (Rys.1), a także całej plejady

białek regulujących stopień polaryzacji tych biopolimerów i ich wzajemnych oddziaływań. Główne składowe cytoszkieletu stanowią dominującą pulę wszystkich białek syntetyzowanych w komórce, np. zawartość aktyny i tubuliny może, w zależności od typu komórki, wynosić od 15-20 %, a białek tworzących filamety pośrednie do 3% (Zemel i Safran 2010; Fletcher i Mullins 2010; Stricker i in. 2010).



**Rys. 1.** Elementy cytoszkieletu: filamety aktynowe, filamety pośrednie, mikrotubule.

Cytoszkielet stanowi *continuum*, jego składowe są ze sobą połączone dzięki obecności białek oddziałujących z filamentami aktynowymi i mikrotubulami (np. CLIP170, tau i EB1) lub filamentami aktynowymi i filamentami pośrednimi (np. hamartyna i spektryna). Co więcej, istnieją doniesienia o bezpośrednim oddziały aktyny z wimentyną, białkiem, które tworzy filamety pośrednie. Integralną częścią cytoszkieletu jest również cytoszkielet podbłonowy, umocowujący struktury cytoszkieletu w błonie komórkowej oraz miejsca przyczepu komórek do podłoża, zbudowane z kompleksów białek współdziałających z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, *extracellular matrix*). Tak więc bodźce wpływające na jeden z elementów cytoszkieletu są przekazywane na jego pozostałe składowe (Fletcher i Mullins 2010).

## 2.2 Elementy budulcowe cytoszkieletu

### 2.2.1 Filamety aktynowe

Filamety aktynowe to długie struktury o średnicy ok. 7 nm, ich długość w komórkach eukariotycznych może wynosić nawet kilka  $\mu\text{m}$ . Są one zbudowane głównie z aktyny, najbardziej zachowanego w ewolucji białka (ok. 90% identyczności pomiędzy izoformami). Aktyna występuje w postaci monomerycznej (G-aktyna o masie cząsteczkowej ok. 42kDa) lub w postaci filamentów (F-aktyna, mikrofilamety). U kręgowców występują trzy główne izoformy aktyny, mięśniowa ( $\alpha$ ), wśród której wyróżnia się podtypy występujące w mięśniu gładkim, szkieletowym i sercowym oraz niemięśniowe ( $\beta$  i  $\gamma$ ) (Fletcher i Mullins 2010; Stricker i in. 2010).

Filamety powstają z niekowalencyjnie powiązanych ze sobą monomerów, ułożonych w podwójną helisę o pełnym obrocie 37 nm, na jeden obrót składa się 7 par protomerów. Polimeryzacja aktyny zachodzi w obrębie całej cytoplazmy (w oparciu o istniejące już filamety) i inicjuje ją wiele czynników, takich jak m. in. wyspecjalizowane białka (np. kompleks białek Arp 2/3 lub forminy), ATP, jony metali dwuwartościowych oraz stężenie soli. Nie jest to jednak polimeryzacja *sensu stricte*, w tym przypadku proces ten należy rozumieć jako przyłączanie się wiązaniami niekowalencyjnymi protomerów do istniejących już filamentów lub oligomerów.

W warunkach *in vitro*, w stanie równowagi dynamicznej, dochodzi do ciągłego wydłużania się filamentu (koniec, do którego przyłączają się monomery nazywany jest kolcem plus kolczastym) z jednoczesnym jego skracaniem na drugim końcu (koniec minus, ostry). Obok filamentów istnieje również pula monomerów aktyny, które plimeryzują w zależności od potrzeb komórki. Zaburzenie w dynamicznej reorganizacji filamentów aktynowych, np. przez falloidynę, która uniemożliwia ich depolimeryzację prowadzi do śmierci komórki.

Filamenty aktynowe są giętkie, w komórce z udziałem innych białek tworzą mniej lub bardziej złożone struktury od luźnej sieci w lamellopodiach (frontalna część komórki) po filopodia (gęsto ułożone równoległe filamenty w ostro zakończonych wypustkach części frontальной) i włókna naprężeniowe, którymi są przebiegające niemal przez całą długość komórki wiązki filamentów połączone poprzez filamenty zbudowane z miozyny, zakotwiczone w błonie komórkowej. To właśnie włókna naprężeniowe, przypominające do pewnego stopnia aparat skurczu mięśni poprzecznie prążkowanych, są strukturami generującymi siłę i naprężenia, a jednocześnie wrażliwymi na stres mechaniczny. Poza miozyną, z aktyną oddziałuje szereg białek, które są odpowiedzialne za organizację cytoszkieletu aktynowego. Wśród nich można wyróżnić: białka oddziałujące z monomerami (np. profilina), białka osłaniające końce filamentów (np. CapZ), białka fragmentujące filament (np. żelsolina), białka sieciujące lub wiążące filamenty (np. filamina lub fascyna) oraz białka stabilizujące filament (np. tropomiozyna). Białka te są aktywowane w odpowiednim dla potrzeb komórki czasie i miejscu, dynamicznie regulując reorganizację cytoszkieletu. Ponadto aktyna może ulegać modyfikacjom potranslacyjnym, które również mogą wpływać na organizację filamentów w komórce (Fletcher i Mullins 2010; Stricker i in. 2010).

Filamenty aktynowe służą również jako „szyny” do przemieszczania po nich ładunków poprzez motory molekularne z nadrodziny miozyn, np. przez miozyny I, V, VI, VII lub XI. Większość z dotychczas poznanych miozyn porusza się w kierunku końca plus mikrofilamentów, wyjątkiem jest tu miozyna VI. Filamenty aktynowe (oraz niektóre motory molekularne) znajdują się również w jądrze komórkowym, gdzie wydają się pełnić funkcje związane z integralnością nukleoszkieletu i -wraz z obecnymi w jądrze miozynami – w transporcie cząstek. Obecna również w jądrze monomeryczna aktyna oddziałuje bezpośrednio z polimerazami RNA, a coraz więcej doniesień wskazuje, że pełni ona rolę czynnika transkrypcyjnego (Stricker i in. 2010; Sellers 1999).

### 2.2.2 Mikrotubule

Mikrotubule to rurkowate struktury o średnicy ok. 25 nm (średnica wewnętrzna to ok. 17 nm), ich długość może osiągać nawet wartość kilku mm. Zbudowane są z dimerów  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubuliny, monomerycznych białek, dość dobrze zachowanych w ewolucji. Masa cząsteczkowa monomeru każdej z tubulin wynosi ok. 50 kDa (Fletcher i Mullins 2010; Hawkins i in. 2010).

W mikrotubuli dimery tubuliny są ułożone jeden na drugim tworząc protofilament, który łącząc się bocznymi (wiązaniami niekowalencyjnymi) z innymi protofilamentami tworzy mikrotubulę. Mikrotubule znajdujące się w cytoszkielecie komórek zwierzęcych składają się z reguły z 13 protofilamentów. W przeciwieństwie do aktyny, polimeryzacja mikrotubul zachodzi w określonym miejscu komórki zwanym centrum organizacji mikrotubuli (MTOC, ang. *microtubule organization centre*) lub centrosomem, znajdującym się w pobliżu jądra komórkowego. Rolę centrosomu pełnią również ciała podstawowe rzęsek w nabłonkach orzęsionych. Centrosom zbudowany jest z pary centrioli oraz pierścieni utworzonych przez izoformę  $\gamma$  tubuliny, stanowiących miejsce nukleacji mikrotubuli. Istnieją dwa podstawowe mechanizmy zależnej od GTP polimeryzacji mikrotubuli: (i) najpierw tworzona jest warstwa protofilamentów, która następnie zwijana jest w mikrotubulę, ten mechanizm obserwowany jest głównie w warunkach *in vitro*; oraz (ii) poprzez przyłączenie poszczególnych podjednostek (dimerów lub protofilamentów) do obecnej w pierścieniach  $\gamma$  tubuliny. Obecny stan wiedzy nie wyjaśnia do końca czy do pierścieni przyłączają się pojedyncze dimery i krótkie protofilamenty, czy też dłuższe fragmenty mikrotubuli, powstałe z ich rozpadu. Z  $\gamma$  tubuliną wiążą się podjednostki  $\alpha$ , z którymi trwale związany jest GDP. Podjednostki  $\beta$  wiążące GTP (i zdolne do jego hydrolizy) znajdują się zawsze na dystalnej części mikrotubuli. W komórkach mikrotubule rosną w kierunku błony komórkowej. Na polimeryzację mikrotubul wpływa szereg czynników, takich jak, GTP, temperatura i obecność białek oddziałujących z mikrotubulami.

Mikrotubule są strukturami sztywnymi (sztywność wzrasta wraz z ich długością), w których oddziaływania pionowe pomiędzy dimerami w poszczególnym protofilamencie są silniejsze niż oddziaływania poziome pomiędzy dimerami sąsiednich protofilamentów. Stąd niezbędne są elementy stabilizujące oddziaływania poziome. W komórkach są nimi białka oddziałujące z mikrotubulami (MAPs, ang. *microtubule-associated proteins*), do których zalicza się m. in. białko tau obecne w aksonie i białko MAP2, obecne w dendrytach. Mikrotubule podobnie jak filamenty aktynowe ulegają depolimeryzacji, która w komórkach przebiega w sposób nagły. Dochodzi do niej wówczas, gdy w podjednostkach  $\beta$  tubuliny na końcach plus doszło do hydrolizy GTP do GDP i/lub niemożliwe jest przyłączenie kolejnych dimerów. Po rozpadzie mikrotubuli następuje ich szybka odbudowa (wykorzystywane są wówczas fragmenty mikrotubul). Do rozpadu mikrotubul dochodzi również podczas podziałów komórki, po rozpadzie mikrotubuli cytoplazmatycznych tworzone jest wrzeciono mitotyczne, które po zakończeniu kariokinezy rozpada się z jednoczesnym utworzeniem mikrotubuli w cytoplazmie. Zaburzenie zdolności tubuliny do polimeryzacji i depolimeryzacji prowadzi do śmierci komórki. Czynnikiem trwale stabilizującym mikrotubule, uniemożliwiającym ich depolimeryzację jest taksol, który jest powszechnie stosowanym lekiem przeciwnowotworowym, silnie hamującym podziały komórkowe. Obie podjednostki tubuliny mogą w mikrotubuli ulegać potranslacyjnym modyfikacjom, które wpływają na zdolność mikrotubuli do wiązania określonych białek, wpływają na ich stabilność oraz warunkują tworzenie przez mikrotubule struktur komórkowych, takich jak np. wici i rzęski.

Mikrotubule, podobnie jak filamenty aktynowe, stanowią „szyny”, po których przemieszczają się ładunki transportowane przez motory molekularne z nadrodziny dynein (ruch w kierunku końca minus) oraz kinezyn (ruch w kierunku końca plus, z wyjątkiem kinezyn należących do rodziny 14) (Hawkins i in. 2010; Suter i Miller 2011).

### 2.2.3 Filamenty pośrednie

Trzecim zespołem włókien cytoszkieletowych są filamenty pośrednie (IF, ang. *Intermediate Filaments*) są trzecim zespołem włókien cytoszkieletowych i występują w prawie wszystkich komórkach eukariotycznych organizmów wielokomórkowych. Ich średnica osiąga około 10 nm, co stanowi wartość pośrednią pomiędzy średnicami dwóch innych głównych elementów cytoszkieletu, aktyny i mikrotubul. Organizacja filamentów pośrednich oraz ich powiązanie z błonami plazmatycznymi sugerują, że ich podstawową rolą jest pełnienie funkcji strukturalnej poprzez wzmacnianie komórek oraz organizowanie ich w tkanki. Natomiast w przeciwieństwie do mikrowłókien i mikrotubul, filamenty pośrednie nie uczestniczą w ruchliwości komórki.

Wszystkie białka podjednostek IF mają wspólną strukturę domenową: centralny rdzeń  $\alpha$ -helikalny otoczony flanką globularnych domen ulokowanych na końcach aminowym i karboksylowym. Rdzeniowa helikalna domena, która jest konserwatywna wśród wszystkich białek IF, składa się z czterech długich  $\alpha$ -helis rozdzielonych trzema niehelikalnymi regionami. Pozycje tych elementów zwanych są również wysoce konserwatywne spośród wszystkich białek IF.

Kilka właściwości fizycznych i biochemicznych odróżnia filamenty pośrednie od mikrowłókien i mikrotubul. Przede wszystkim, jak wspomniano wcześniej, różnią się rozmiarem od pozostałych dwóch typów komponentów cytoszkieletu, osiągając rozmiary 10nm. Po drugie, filamenty pośrednie są strukturami wyjątkowo stabilnymi. Nawet po ekstrakcji roztworami zawierającymi detergenty i wysokie stężenia soli większość filamentów pośrednich pozostaje w komórce w stanie nienaruszonym, podczas gdy mikrowłókna i mikrotubule depolimeryzują do swoich rozpuszczalnych podjednostek. Ponadto podjednostki IF nie wiążą nukleotydów, a ich łączenie w filamenty pośrednie nie wymaga hydrolizy nukleotydowej (GTP lub ATP).

U wyższych kręgowców podjednostki tworzące filamenty pośrednie stanowią nadrodzinę wysoce  $\alpha$ -helikalnych białek. W przeciwieństwie do izoform aktyny i tubuliny, które są polimerami pojedynczego typu białek, włókna pośrednie składają się z wielu białek. Ponad pięćdziesiąt różnych białek filamentów pośrednich zostało zidentyfikowanych i podzielonych na sześć kategorii w oparciu o podobieństwa między ich sekwencjami aminokwasowymi. Klasy białek IF są bardzo rozbieżne w sekwencji, różnią się znacznie pod względem masy cząsteczkowej oraz ulegają ekspresji w różnych typach komórek. Poniżej omówione zostanie pięć najważniejszych klas. Klasy I i II składają się



z dwóch grup keratyn: kwasowych (typu I) i zasadowych /obojętnych (typu II) i zwykle ulegają ekspresji w komórkach nabłonka. Keratyny są najbardziej zróżnicowanymi klasami białek IF, z dużą liczbą ekspresjonowanych izoform keratynowych. Każdy typ komórki nabłonkowej syntetyzuje co najmniej jedną keratynę typu I i jedną typu II, które łączą się w stosunku 1: 1, tworząc heterodimery, które łączą się w heteropolimeryczne włókna keratynowe. Dodatkowo, w zależności od typu komórek, w których występują keratyny można podzielić na dwie grupy. Tak zwane keratyny twarde, są charakterystyczne dla „twardych” tkanek nabłonkowych i są używane do produkcji struktur takich jak włosy, paznokcie i rogi. Drugi typ - miękkie keratyny - zwane także cytokeratynami licznie występują w cytoplazmie nabłonka, który wyściela wewnętrzne wnęki ciała. Co więcej każdy typ nabłonka zawsze posiada charakterystyczne połączenie keratyn typu I i typu II. Włókna filamentów pośrednich typu III obejmują cztery białka – wimentynę (obecna np. w fibroblastach i leukocytach), desminę (w mięśniach), kwaśne białko włóknikowe GFAP (w gleju) i peryferinę (w neuronach obwodowych). W przeciwieństwie do keratyn, białka typu III mogą tworzyć zarówno homo-, jak i heteropolimerowe włókna IF. Białka filamentów pośrednich typu IV obejmują trzy białka neurofilamentów (NF), które różnią się znacznie masą cząsteczkową i oznaczane są odpowiednio jako NF-L, NF-M i NF-H dla lekkiego, średniego i ciężkiego. W przeciwieństwie do mikrotubul, które kierują wydłużeniem aksonu, neurofilamenty odpowiadają za radialny wzrost aksonu i tym samym określają jego średnicę. Inne białko typu IV -  $\alpha$ -interneksyna- ulega ekspresji na wcześniejszym etapie rozwoju neuronów, przed ekspresją białek neurofilamentowych, zaś nestyna pojawia się jeszcze wcześniej podczas rozwoju neuronów w komórkach macierzystych ośrodkowego układu nerwowego. W przeciwieństwie do lokalizacji cytozolowej pozostałych czterech klas białek IF, białka typu V, zwane laminami, występują wyłącznie w jądrze. Możemy wyróżnić laminę A, B i C. Spośród trzech jądrowych lamin, dwie są produktami alternatywnego splicingu kodowanymi przez wspólny gen, podczas gdy trzecia lamina jest kodowana przez oddzielny gen. Główną funkcją lamin jądrowych jest tworzenie włóknistych sieci, które podtrzymują błonę jądrową (Qin i in. 2010; Goldman i in. 2008).

Filamenty pośrednie ulegają szerokiej dystrybucji w komórkach i można je znaleźć zarówno w cytoplazmie, jak również naokoło i wewnątrz jądra komórkowego. W zależności od ich lokalizacji, pełnią różne funkcje. Filamenty pośrednie tworzą rozbudowaną sieć w cytoplazmie większości komórek, rozciągającą się od pierścienia otaczającego jądro do błony plazmatycznej. IF może wiązać się nie tylko z błoną komórkową, ale także z innymi elementami cytoszkieletu, dzięki czemu zapewnia rusztowanie integrujące elementy szkieletu i organizujące wewnętrzną strukturę komórki (Friedl i in. 2011). W cytoplazmie filamenty pośrednie składające się z keratyny są ściśle zakotwiczone w błonie plazmatycznej w dwóch specyficznych obszarach kontaktów komórkowych tak zwanych desmosomach i hemidesmosomach, które są odpowiedzialne za łączenie komórek. Desmosomy pośredniczą w przyleganiu komórek między sobą, a hemidesmosomy są odpowiedzialne za przyłączanie komórek do błony podstawnej.

W wyniku połączeń między filamentami pośrednimi a tymi złączami komórkowymi siły ścinające są rozpraszane z jednego regionu warstwy komórkowej do całego arkusza komórek nabłonkowych, zapewniając wytrzymałość i sztywność całego nabłonka. (Qin i in. 2010) Istotny jest fakt, że filamenty keratynowe zakotwiczone na obu stronach desmosomu służą jako mechaniczne połączenie pomiędzy sąsiednimi komórkami w warstwie nabłonkowej, zapewniając tym samym mechaniczną stabilność całej tkance. W jądrze komórkowym natomiast filamenty pośrednie obecne są zarówno wewnątrz jak i na zewnątrz. Przyłączenie filamentów pośrednich do zewnętrznej strony błony jądrowej zapewnia właściwe umiejscowienie jądra w komórce, natomiast blaszka jądrowa utworzona z IF wzdłuż wewnętrznej powierzchni błony jądrowej, zapewnia jego mechaniczne podparcie.

### 2.3 Metody pomiaru właściwości biomechanicznych komórki

Zmiany w organizacji cytoszkieletu, indukowane przez różne czynniki środowiskowe, objawiają się zmianami w właściwościach mechanicznych komórki. W zależności od źródła przegrupowania cytoszkieletu, wynikające z tego zmiany mogą być korzystne lub szkodliwe dla

komórki. Pomiary właściwości mechanicznych komórki mogą być użyteczne w zrozumieniu przyczyny reorganizacji cytoszkieletu.

Postęp technologiczny ostatnich dekad spowodował powstanie innowacyjnych metod badawczych, umożliwiających wykrycie zmian w organizacji cytoszkieletu, przejawiających się różnicą w deformowalności komórek. Do najbardziej popularnych technik pomiaru właściwości mechanicznych komórki należą: metoda zasysania fragmentów komórek za pomocą mikropipety (Hochmuth RM (2000), przepływu laminarnego (Tissot i in.1992), cytometria magnetyczna (Feneberg i in. 2004), metoda szczypcy optycznych (Guck i in. 2005), metoda ściskania pojedynczej komórki płaskimi powierzchniami (Thoumine i Ott 1999) oraz cytoindenter (Shin i Athanasiou 1999).

W zależności od rodzaju stosowanej techniki, siła zewnętrzna powodująca deformację komórki może być przykładana lokalnie (jak to jest w przypadku mikroskopii sił atomowych), rozłożona na większym obszarze (np. w technice ściskania pojedynczej komórki pomiędzy dwiema płaskimi powierzchniami) lub przykładana poprzez receptory powierzchniowe (integryny), jak to jest w przypadku cytometrii magnetycznej. Konsekwencją stosowania technik różniących się sposobem, wielkością, oraz prędkością przykładania siły jest różnorodność odpowiedzi mechanicznej komórki, prowadząca do wielu modeli teoretycznych opisujących zachowanie się komórki.

Różnorodność modeli teoretycznych stosowanych do opisu własności mechanicznych pojedynczych komórek prowadzi do względnego opisu zmian zachodzących w pojedynczej komórce. Stąd główną rolę w badaniach odgrywają pomiary porównawcze.

Najczęściej używaną techniką, w celu określenia mechanicznych właściwości komórek jest metoda nanoindentacji sondą AFM, oparta na mikroskopii sił atomowych AFM (Lekka i Laidler 2009). Typowy mikroskop sił atomowych zbudowany jest z trzech podstawowych elementów, którymi są: (i) sprężynka z zamocowanym na jej końcu ostrzem, (ii) układ rejestrujący wychylenia sprężynki z położenia równowagi oraz (iii) układ poruszania i skanowania próbką (Rys.2) Sprężynka wraz z umieszczoną na jej końcu igłą (zwana inaczej sondą AFM lub próbnikiem) stanowi najważniejszy element mikroskopu. Igły umieszczone na ich końcu posiadają kształt czworobocznej piramidy wysokości kilku mikrometrów i o promieniu krzywizny zaostrego końca rzędu kilku – kilkudziesięciu nanometrów (zwykle od 5 nm do 50 nm).

W mikroskopie sił atomowych sonda AFM jest przesuwana w bliskiej odległości nad badaną powierzchnią. Siły działające pomiędzy atomami zakończenia igły a atomami powierzchni powodują wychylenie sprężynki. Rejestracja wychylenia (ugięcia) sprężynki z położenia równowagi jest realizowana zwykle poprzez system optyczny składający się z diody laserowej i pozycyjnie czułego fotodetektora.

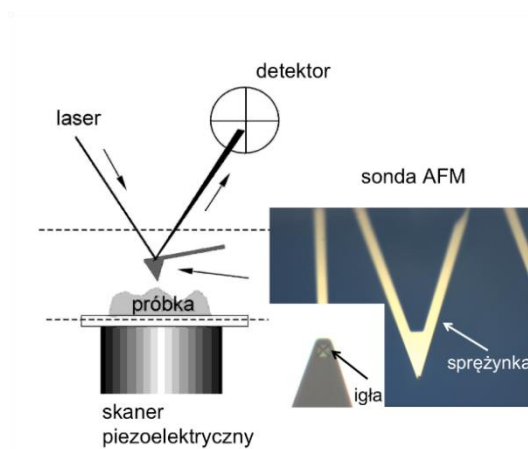
Ugięcie sprężynki jest rejestrowane w następujący sposób: wiązka laserowa, po jej precyzyjnym zogniskowaniu na końcu sprężynki, odbija się od jej powierzchni i jest rejestrowana przez diodę detekcyjną. Gdy pojawia się oddziaływanie powodujące wychylenie sprężynki, położenie odbitej wiązki laserowej zmienia się, przy czym mierzony sygnał detektora jest proporcjonalny do wychylenia sprężynki.

Poruszanie i skanowanie próbką jest najczęściej realizowane za pomocą skanera piezoelektrycznego oraz dodatkowego modułu zapewniającego wygodną zgrubną manipulację próbką (zwykle stosowany jest albo silnik krokowy albo dodatkowy element piezoelektryczny).

Badanie własności mechanicznych żywych komórek wymaga pracy mikroskopu w trybie spektroskopii siły, w którym obrazowanie (czyli skanowanie w płaszczyźnie XY) jest wyłączone. W trybie tym, w zadanych punktach na płaszczyźnie rejestruje się wychylenie sprężynki z położenia równowagi w funkcji względnej pozycji skanera piezoelektrycznego. Uzyskana w ten sposób zależność jest przetwarzana się na relację pomiędzy siłą a odległością igła–badana powierzchnia (tzw. krzywe „siła-odległość”).

Ilościowa analiza danych pochodzących z pomiaru elastyczności dokonywanych za pomocą AFM polega na wyznaczeniu zależności siła naciskająca – ugięcie materiału (*inaczej indentacja*) na podstawie porównania krzywych „siła – odległość” zmierzonych dla powierzchni referencyjnej (krzywa kalibracyjna) oraz badanej próbki.

Zmierzone krzywe – kalibracyjna i doświadczalna – są odejmowane od siebie i w efekcie uzyskuje się zależność siła nacisku – ugięcie materiału (indentacja). Ta zależność jest charakterystyczna dla danego materiału i stanowi podstawę do wyznaczenia wartości modułu Young’a. Jednym z powszechnie stosowanych modeli teoretycznych opisujących odkształcenie elastyczne powierzchni naciskanej z siłą  $F$  jest model Hertza rozszerzony przez Sneddon’a (Sneddon 1985).



**Rys. 2.** Schemat budowy mikroskopu sił atomowych. Inset: obraz optyczny sondy AFM – sprężynki z zamocowaną na końcu igłą o kształcie czterobocznej piramidy.

### 3. Podsumowanie

Dzięki technikom eksperymentalnym, które są obecnie dostępne do studiowania właściwości cytoszkieletu, od obrazowania w super-rozdzielczości organizacji molekularnej, po fizyczne metody manipulacji strukturami i procesami komórkowymi, istnieje wiele możliwości badania związku między działaniem sił wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych i zachowaniem komórek. W celu prowadzenia kolejnych eksperymentów i poszukiwania mechanizmów i cząstek łączących mechanikę komórkową i cytoszkieletu do podejmowania decyzji komórkowych konieczny jest dalszy rozwój obecnie dostępnych technik i modeli teoretycznych. Wydaje się, że w tym zakresie symulacje obliczeniowe będą stawać się coraz bardziej istotną metodą badania właściwości hierarchicznie uporządkowanych układów, również biologicznych, co w przyszłości może przyczynić się do głębszego poznania zachowania zdrowych i patologicznych komórek, a co za tym idzie mechanizmu rozwoju wielu chorób.

### 4. Literatura

- Feneberg W, Aepfelbacher M, Sackmann E (2004) Microviscoelasticity of the apical cell surface of human umbilical endothelial cells (HUVEC) within confluent monolayers. *Biophysical Journal* 87: 1338–1350.
- Fletcher DA, Mullins RD (2010) Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463(7280): 485–492.
- Friedl P, Wolf K, Lammerding J (2011) Nuclear mechanics during cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* 23: 55–64.
- Goldman RD, Grin B, Mendez MG, Kuczmarski ER (2008) Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Current Opinion in Cell Biology* 20: 28–34.
- Guck J, Schinkinger S, Lincoln B, Wottawah F, Ebert S, Romeyke M, Lenz D, Erickson HM, Ananthakrishnan R, Mitchell D, Käs J, Ulvick S, Bilby C (2005) Optical deformability as an inherent cell marker for testing malignant transformation and metastatic competence. *Biophysical Journal* 88: 3689–3698.

- Hawkins T, Mirigian M, Selcuk Yasar M, Ross JL (2010) Mechanics of microtubules. *Journal of Biomechanics* 43: 23-30.
- Hochmuth RM (2000) Micropipette aspiration of living cells. *Journal of Biomechanics* 33: 15–22.
- Ingber DE, Jamieson JD (1985) Cells as tensegrity structures: architectural regulation of histodifferentiation by physical forces transduced over basement membrane. *Gene Expression During Normal and Malignant Differentiation* (red. Andersson LC, Gahmberg CG, Ekblom P), Academic Press: 13-32.
- Lekka M, Laidler P (2009) Applicability of AFM in cancer detection. *Nature Nanotechnology* 4: 72.
- Qin Z, Buehler MJ, Kreplak L (2010) A multi-scale approach to understand the mechanobiology of intermediate filaments. *Journal of Biomechanics* 43: 15-22.
- Sellers JR (1999) *Myosin. Protein Profile*. Oxford University Press.
- Shin D, Athanasiou K (1999) Cytoindentation for obtaining cell biomechanical properties. *Journal of Orthopaedic Research* 17: 880–890.
- Sneddon I (1985) The relation between load and penetration in axisymmetric Boussinesq problem for a puncg of arbitrary profile. *International Journal of Engineering Science* 3: 47–57.
- Stricker J, Falzone T, Gardel ML (2010) Mechanics of the F-actin cytoskeleton. *Journal of Biomechanics* 43: 9-14.
- Suter DM, Miller KE (2011) The emerging role of forces in axonal elongation. *Progress in Neurobiology* 94: 91-101.
- Thoumine O, Ott A (1999) Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *Journal of Cell Science* 110: 2109–2116.
- Tissot O, Pierres A, Foa C, Delaage M, Bongrand P (1992) Motion of cells sedimenting on a solid surface in a laminar shear flow. *Biophysical Journal* 61: 204–215.
- Zemel A, Safran S (2010) Theoretical concepts and models of cellular mechanosensing. *Methods in Cell Biology* 98: 143-175.

## **6. Sposoby i mechanizmy migracji komórek**

Types and mechanisms of cells movement

Szydlak Renata, Trojan Sonia

Katedra Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Piotr Laidler

Renata Szydlak: renata.szydlak@uj.edu.pl

Słowa kluczowe: migracja komórkowa, ruch: mezenchymalny, ameboidalny, kolektywny, chemokiny, czynniki wzrostu

### **Streszczenie**

Ruchliwość komórkowa jest złożonym procesem biologicznym niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmów wielokomórkowych we wszystkich etapach życia; od rozwoju zarodkowego, morfogenezę i gojenie się ran po zjawiska patologiczne, takie jak nowotworzenie i przerzutowanie. Ostatnie badania wskazują, że dla prawidłowego opisu mechanizmu ruchliwości komórek, oprócz tradycyjnych testów migracji, istotne są także czynniki chemiczne, fizyczne i mechaniczne. Niniejszy rozdział poświęcony jest strategiom migracji komórek oraz mechanobiologicznym zmianom, które towarzyszą dynamicznym interakcjom pomiędzy komórkami podczas migracji.

### **1. Wstęp**

Migracja komórkowa ma kluczowe znaczenie dla wielu procesów biologicznych; począwszy od okresu rozwoju zarodkowego, morfo- i organogenezy, po odpowiedź immunologiczną i proces gojenia się ran. Ruchliwość komórek istotna jest również w zjawiskach patologicznych takich jak choroby układu sercowo-naczyniowego i przerzutowanie nowotworów. Podczas tych procesów migracji komórki poruszają się w przestrzeniach międzykomórkowych, tzw. macierzy zewnątrzkomórkowej, o szerokim spektrum właściwości biochemicznych, fizycznych i mechanicznych (Charras i Sahai 2014). Macierz zewnątrzkomórkową (ECM, ang. Extracellular Matrix) stanowią mogą zarówno struktury 2D, takie jak błona podstawna jak również złożone struktury 3D, takie jak tkanki łączne. ECM odpowiada mechaniczną stabilność tkanki i jej integralność oraz rusztowanie dla komórek. Pełni również funkcję „medium sygnałowego”, jednocześnie stanowiąc fizyczną barierę ochronną komórek, filtr biofizyczny, który kontroluje przekazywanie składników odżywczych i produktów odpadowych, mediatorów i wszelkich innych substancji ze środowiska do komórki (Lu i in. 2012). Rola ECM w migracji komórkowej obejmuje zarówno zjawiska molekularne, jak i fenomenologiczne. Dynamiczne ruchy komórkowe, w tym migracja, możliwe są dzięki reakcji składników wewnątrzkomórkowych na bodźce ze środowiska zewnętrznego.

### **2. Przegląd literatury**

#### **2.1 Sposoby migracji komórek**

Migrację komórek można podzielić na dwa sposoby: (1) tryb indywidualnej migracji komórek, który obejmuje ruch mezenchymalny i ameboidalny oraz (2) kolektywny tryb migracji komórek, w którym zachowane są połączenia międzykomórkowe a grupa komórek porusza się w sposób skoordynowany (Rys.1).

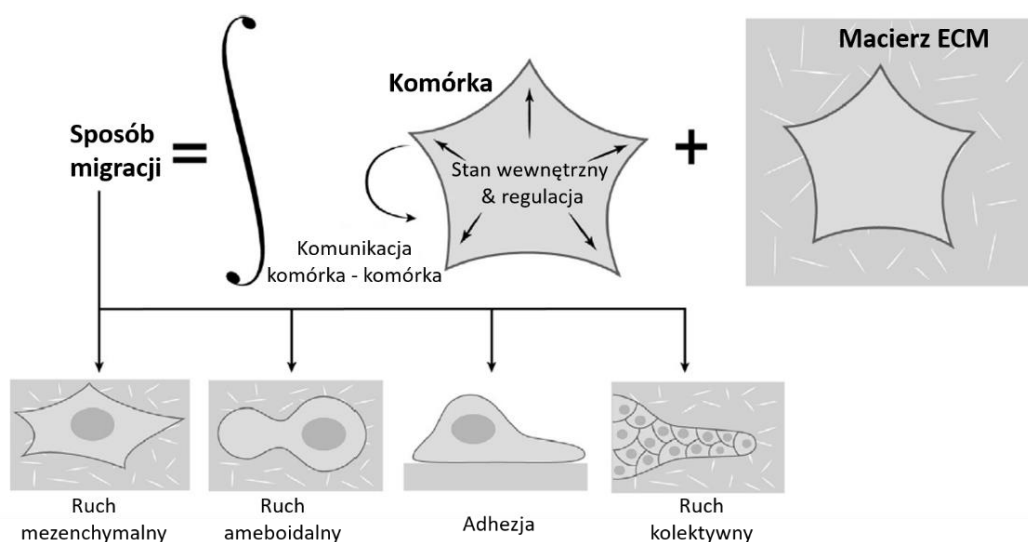
##### **2.1.1 Ruch mezenchymalny**

Mezenchymalny sposób migracji jest dość dobrze poznany i opisany. Jego cechy, przez wiele lat obserwowane w doświadczeniach prowadzonych na podłożach dwuwymiarowych (2D), przypisywano ogólnie uznanemu modelowi migracji komórkowej.

Jednymi z najbardziej typowych przykładów komórek migrujących w sposób mezenchymalny są keratynocyty i fibroblasty. Komórki nowotworowe tak migrujące to w większości

komórki wywodzące się z tkanki łącznej, np. mięsaka, czy z tkanek nabłonkowych, np. raka jelita grubego. W środowisku trójwymiarowym komórki mezenchymalne przyjmują wrzecionowatą morfologię, charakterystyczną dla fibroblastów, mioblastów, komórek mięsaka czy pojedynczych komórek nabłonkowych. Mezenchymalny sposób poruszania się komórek cechuje pięcioetapowy cykl lokomocyjny. Pierwszy etap migracji komórki to jej polaryzacja, czyli określenie kierunku ruchu i podblonowe gromadzenie białek regulujących ten proces. W drugim, zależnym od polimeryzacji aktyny, protruzyjnym etapie migracji, lamellipodium formuje miejsca adhezji do substratu za pośrednictwem heterodimerów  $\alpha, \beta$ -integrzyn. Płytkka adhezyjna służy jako miejsce przyczepu komórki do podłoża, niezbędne dla wytworzenia się mechanicznego napięcia w podblonowej części komórki i kluczowe dla dalszego jej poruszania się (Gupton i in. 2005). Kompleksy integrzynowe za pośrednictwem białek adaptorowych (takich jak  $\alpha$ -aktynina, paksylina, talina i winkulina) służą jako miejsce zakotwiczenia dla filamentów aktyny, a także pośredniczą w przekazywaniu sygnałów (z udziałem kinaz Src i Fak). Jednocześnie, wraz z utworzeniem miejsc adhezji, niezbędny jest udział lokalnie wydzielanych do środowiska lub związanych z zewnętrzną błoną komórkową proteaz (MMP, uPA/uPAR), służących enzymatycznej przebudowie włókien białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM). Komórka poruszająca się w sposób mezenchymalny powoduje degradację włókien macierzy zewnątrzkomórkowej, co może być wykorzystywane również przez inne metastatyczne komórki nowotworowe, sprzyjąc tworzeniu tzw. komórkowych łańcuchów migracyjnych i zwiększając szansę wystąpienia przerzutów.

Proces mezenchymalnego ruchu komórkowego to cykl następujących po sobie zjawisk, których powtarzalność wymaga bardzo precyzyjnej kontroli, a samo jego zapoczątkowanie wiąże się z powstawaniem i zanikaniem ukierunkowanych wypustek komórkowych. Komórki pobudzone do migracji w ciągu kilku minut prezentują lamellipodium, które tworzy się w wyniku niezwykle dynamicznej polimeryzacji aktyny (Condeelis i in. 2001).



Rys. 1. Sposoby migracji komórek.

### 2.1.2 Ruch ameboidalny

Komórki, w szczególności nowotworowe, mogą migrować w sposób odmienny od mezenchymalnego, podobny do sposobu poruszania się przeciskających się przez ścianę naczyń krwionośnych leukocytów. Ten typ ruchu komórkowego charakteryzuje się wysokim stopniem „deformacji” ciała komórki oraz występowaniem sferycznych, przypominających pęcherzyki apoptotyczne, wypustek błony komórkowej. Komórki nowotworowe poruszające się w ten sposób

zawdzięczają zdolność do translokacji gwałtownie przyspieszającym cykлом ekspansji i retrakcji wypustek oraz skurczom ciała komórki. W ich przypadku wykazano również zdolność do szybkich zmian kierunku ruchu. Wynika to z możliwości dynamicznego, kilkuminutowego tworzenia się i likwidacji pęcherzyków migracyjnych, czemu towarzyszy zmiana polaryzacji komórki (Pinner i Sahai 2008). Ruch ameboidalny charakteryzuje wiele cech odmiennych w porównaniu z mezenchymalnym typem migracji komórkowej. Przede wszystkim w ameboidalnym typie ruchu komórkowego to nie polimeryzacja filamentów aktynowych jest główną siłą powodującą powstawanie protruzji. Ponadto, enzymatyczna proteoliza nie służy w tym przypadku do pokonania bariery migracyjnej jaką jest macierz zewnątrzkomórkowa. Stąd zastosowanie inhibitorów metaloproteinaz nie powoduje zmniejszenia zdolności inwazyjnych tych komórek nowotworowych zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*.

Komórki poruszające się w sposób ameboidalny generują tzw. siłę kurczliwą, w oparciu o współdziałanie aktyny i miozyny II. Dzięki temu następuje odkształcenie włókien macierzy zewnątrzkomórkowej, a komórki przeciskają się między jej elementami wg niżej opisanego mechanizmu (Paluch i in. 2006). Pierwszy etap inwazji macierzy zewnątrzkomórkowej rozpoczyna się utworzeniem sferycznych wypustek migracyjnych. Ich powstawanie jest możliwe dzięki wzrostowi ciśnienia hydrostatycznego, które powoduje lokalne uwypuklenie błony komórkowej. W sytuacji spoczynku komórki ciągłość przylegania błony komórkowej do podbłonowej sieci białkowej (w skład której wchodzi aktyna, filamina,  $\alpha$ -aktynina czy miozyna) stabilizowana jest przez poprzez liczne miejsca kontaktowe (Zaidel-Bar i in. 2003). Utworzenie pęcherzyka migracyjnego skutkuje utratą tych stabilnych połączeń i w początkowym etapie pęcherzyki migracyjne pozbawione są F-aktyny. Ten niewielki uwypuklony region wypełnia się następnie cytoplazmą i w ciągu kilku sekund formuje sferyczną strukturę, w której stopniowo rozpoczyna się odbudowa sieci cytoszkieletu aktynowego.

### 2.1.3 Ruch kolektywny

Kolektywny sposób migracji zaobserwować można w następujących procesach fizjologicznych: migracja fragmentów nabłonków po płaskich substratach, takich jak błona śluzowa jelita podczas jego samoodnawiania, ruch warstw keratynocytów i fibroblastów w kierunku miejsca zranienia, czy warstw komórek przemieszczających się w procesie organogenezy. W warunkach *in vitro* najczęściej stosowanym modelem dla kolektywnego typu ruchu jest test gojenia ran, w którym fibroblasty zamykają przestrzeń powstałą po przerwaniu ciągłości monowarstwy komórek na płycie hodowlanej (Montell 2008). Kolektywny sposób migracji komórkowej polega na wspólnym przemieszczaniu się grup komórek przy funkcjonalnie zachowanych połączeniach międzykomórkowych. Komórki te zachowują pierwsze cztery z pięciu etapów ruchu wyżej opisanych dla komórek poruszających się w sposób mezenchymalny. Zapoczątkowujące ruch kolektywny komórki przechodzą etap protruzji, adhezji do podłoża, enzymatycznego trawienia białek macierzy zewnątrzkomórkowej i skurczu ciała komórki. Końcowy etap tego procesu, w odniesieniu do mezenchymalnego sposobu migracji zawiera ważne modyfikacje. Retrakcyjny koniec komórki nie ulega oddzieleniu od grupy komórek, ale utrzymuje międzykomórkowe połączenia, które służą przeniesieniu siły skurczu na komórki znajdujące się dalej od strefy frontальной (Wolf i Friedl 2006) Poruszające się komórki strefy frontальной, podobnie jak komórki poruszające się w sposób mezenchymalny, wydzielają zewnątrzkomórkowe proteazy, takie jak: MT1-MMP i MMP-2.

Podsumowując, widzimy, iż niewątpliwą „korzyścią” kolektywnego sposobu migracji komórkowej (z punktu widzenia rozprzestrzeniania nowotworów) jest swoisty mechanizm, polegający na torowaniu drogi migracji poprzez białka macierzy zewnątrzkomórkowej czy zdrowe tkanki organizmu oraz wytworzenie lokalnego środowiska typowego dla guza pierwotnego. *In vivo* komórki poruszają się w kierunku bogatych w składniki odżywcze naczyń krwionośnych lub limfatycznych. Inwazyjność komórek nowotworowych jest więc zjawiskiem adaptacyjnym, w dużej mierze zależnym od warunków środowiska. Ostatnie badania pokazują, iż nabycie bądź utrata komponentów determinujących dany typ migracji komórkowej, czy to wskutek wyciszania genów czy ingerencji farmakologicznej, prowadzi do zmiany wzoru i mechanizmu przemieszczania się.

## 2.2 Czynniki zewnętrzne indukujące migrację komórkową

Migracja komórkowa jest indukowana lub hamowana na skutek zewnętrznych czynników fizycznych, mechanicznych i/lub biochemicznych.

### 2.2.1 Czynniki fizyczne i mechaniczne

Komórki są w stanie poruszać się na tyle, na ile pozwoli im ich otoczenie, a ponieważ ruch komórki wymaga zmian kształtu komórki, ograniczenia mogą wpływać na wiele parametrów komórkowych. W strukturach trójwymiarowych, takich jak tkanka łączna, efekt zamknięcia jest w dużej mierze określony przez porowatość matrycy, którą komórka penetruje. Gdy pory są mniejsze niż rozmiar komórki, komórka musi się zmienić kształt, w celu przemieszczenia się przez pory. Im mniejszy rozmiar porów, tym trudniej komórce się przez nie przemieścić. Dodatkowo w tym procesie istotna jest również mechaniczna odporność komórki na odkształcenia, definiowana jako sztywność komórki i opisywana za pomocą moduły Younga. Niska sztywność komórek lub wysoka odkształcalność (poniżej  $\sim 500$  Pa do  $\sim 2$  kPa dla normalnych komórek) jest skorelowana z potencjałem przerzutowym (Xu i in. 2012) i może być stanowić mechaniczny biomarker do szybkiego fenotypowania komórek (Otto i in. 2015). Ostatnie badania wykazały, że rozmiar i odkształcalność jądra komórkowego jest czynnikiem ograniczającym zdolność komórki przeciskania się przez ciasne pory o wielkości porów 1-2  $\mu\text{m}$  (Wolf i in. 2013). W przypadku powierzchni 2D, takich jak standardowe hodowle komórkowe, komórka ma większą przestrzeń do poruszania, więc migracja napędzana jest przez lamellopodia oraz polimeryzację i depolimeryzację włókien aktynowych (Lauffenburger i Horwitz 1996). Migracja w środowiskach o większych ograniczeniach geometrycznych, takich jak rury, kanały oraz naturalne powierzchnie nieciągłe wymaga określenia większej ilości parametrów, takich jak kurczliwość komórek, topografia powierzchni, powierzchnia adhezji (Wilson i in. 2013).

Fizjologiczną ECM cechuje ogromna różnorodność i złożoność, co związane jest z pełnią funkcją regulatorową dla różnego rodzaju komórek (Kim i in. 2012). Przykładowo innym parametrem wpływającym na ruchliwość komórek jest sztywność podłoża. *In vivo* występują powierzchnie o sztywności  $\sim 100$  Pa, takie jak tkanka tłuszczowa, mózg, oraz powierzchnie bardziej twarde, rzędu MPa i GPa, takie jak kości (Discher i in. 2005).

### 2.2.2 Czynniki biochemiczne

Poza komunikacją mechaniczną komórki oddziałują między sobą poprzez wysyłanie i odbieranie sygnałów biochemicznych oraz wydzielanie różnych substancji, takich jak chemokiny, metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP, ang. matrix metalloproteinases) i czynniki wzrostu, które mogą wpływać na aktywność migracyjną komórek.

Chemokiny to niskocząsteczkowe białka z grupy cytokin, które wydzielane są przez komórki. Aktywność chemokin związana jest z pobudzeniem swoistych dla nich receptorów błonowych. Profil ekspresji tych receptorów decyduje o wrażliwości komórek na bodziec chemotaktyczny i ruch komórki w kierunku gradientu stężeń. Wzrost stężenia chemokin *in vivo* wywołują cytokiny prozapalne, czynniki wzrostu lub patogeny (Rossi i Zlotnik 2000). Doskonałym przykładem ściśle kontrolowanej i mediowanej przez chemokiny procesem jest ruch leukocytów do rany (Devreotes i Zigmond 1988). Gradient chemokinowy odgrywa również ważną rolę w przypadku przerzutowania nowotworów. Komórki czerniaka i glejaka wydzielają chemokiny, które są silnym bodźcem chemotaktycznym dla leukocytów, limfocytów typu T oraz neutrofilii (Mrowietz i in. 1999).

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej to grupa zależnych od cynku enzymów proteolitycznych, należących do endopeptydaz. MMP w organizmie mogą znajdować się w stanie aktywnym lub nieaktywnym i również pełnią istotną funkcję w procesie migracji komórkowej. Przykładowo podczas procesu gojenia ran MMP-1 oddziałuje z keratynocytami poprzez  $\alpha 2\beta 1$  i wspiera w migrację tych komórek przez macierz kolagenową. Degradacja macierzy kolagenowej przez MMP-1 ma kluczowe znaczenie dla ruchliwości keratynocytów, ponieważ komórki te nie są w stanie poruszać się po żelu kolagenowym (Pilcher i in. 1997). Podczas przerzutów nowotworowych, w szczególności nowotwory złośliwe w sposób parakryny stymulują komórki zręb



do wydzielania większości MMP (McKerrow i in. 2000). Metaloproteinazy 1, 2, 3, 9 i 14 odgrywają istotną rolę w degradacji fizycznej bariery w postaci ECM dla inwazji nowotworów oraz nacieku na śródbłonek naczyniowy, co wspiera proces metastazy (Sternlicht i Bergers 2000).

Czynniki wzrostu to peptydy, które pobudzają inne komórki do podziału, różnicowania lub ruchu w ich kierunku. Działają za pośrednictwem swoistych receptorów na powierzchni komórek docelowych. Odpowiedzialne są za kontrolowanie dynamicznej komunikacji między komórką a macierzą lub między komórkami. Niektóre z nich związane są z regulacją ruchliwości komórek, np. czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, ang. fibroblast growth factor) czynnik wzrostu naskórka (EGF, ang. epidermal growth factor), płytkowy czynnik wzrostu (PDGF, ang. platelet-derived growth factor) i transformujący czynnik wzrostu (TGF- $\beta$ , ang. transforming growth factor  $\beta$ ). Przykładowo podczas procesu gojenia się rany, płytki degranulują wydzielają EGF, PDGF i TGF- $\beta$ . FGF reguluje ruchliwość komórkową poprzez reorganizację struktur cytoszkieletu aktynowego i polaryzację komórek (Bottcher i Niehrs 2005). PDGF i cytokiny, takie jak IL-1, działają jednocześnie w celu przyciągnięcia neutrofilów do uszkodzonego miejsca, w celu usunięcia zanieczyszczeń bakteryjnych (Hantash i in. 2008). Komórki nowotworowo-zrębowe wydzielają czynniki stymulujące wzrost i przerzutowanie komórek nowotworowych (Hu i in. 2013). Internalizacja aktywowanego na powierzchni komórki receptora FGF jest związana ze zwiększoną migracją komórek i progresją nowotworu.

### 2.3 Rola białek Rho w procesie migracji komórkowej

Komórki mogą rozpocząć migrację pod wpływem rozmaitych bodźców zewnętrznych lub wewnętrznych. W odpowiedzi na te czynniki aktywowane zostają różne receptory i uruchomiona zostaje wyspecjalizowana maszynaria białkowych kaskad przekazywania sygnałów. Ogniwami tych szlaków są między innymi białka Rho – GTPazy, należące do nadrodziny białek Ras. Rodzina białek Rho występuje we wszystkich organizmach eukariotycznych, od mikroorganizmów po ssaki. Tworzą je monomeryczne, stosunkowo małe proteiny o masie od 20 do 30 kDa. Ponadto są to białka o znacznym stopniu homologii sekwencji aminokwasowej wykazujące ponad 50% identycznych aminokwasów. Odgrywają one wiele ważnych ról między innymi w przekazywaniu sygnałów wewnątrzkomórkowych i kontrolowaniu wielu istotnych procesów komórkowych, takich jak: migracja, transport błonowy, adhezja, polarność czy zmiana kształtu komórki. Białka te współdziałają w sposób antagonistyczny lub synergistyczny z innymi białkami szlaków sygnałowych a także z wtórnymi przekaźnikami informacji.

U ssaków zidentyfikowano 20 genów kodujących białka Rho i podzielono je na 5 grup: Rho, Rac, Cdc42, Rnd i RhoBTB. Najlepiej poznanymi oraz pełniącymi istotną rolę w kontroli organizacji cytoszkieletu są białka Rho, Rac i Cdc42. Aktywne białko RhoA stymuluje formowanie ognisk kontaktowych oraz włókien naprężeniowych kontrolując tym samym proces translokacji ciała komórki. Białka Cdc42 i Rac natomiast przykładowo aktywnie uczestniczą w początkowych stadiach procesu migracji komórkowej takich jak organizacja miejsc adhezji w strefie frontальной, polaryzacji komórki oraz między innymi indukują powstawanie odpowiednio filopodiów i lamelipodiów – rodzaje wypustek migracyjnych.

Białka Rho funkcjonują w komórkach w postaci molekularnych przełączników oscylując pomiędzy aktywnym stanem związanym z GTP, a nieaktywną postacią związaną z GDP. Wymiana nukleotydów guanidynowych jest kontrolowana przez trzy grupy białek regulatorowych GEF (guanine nucleotide exchange factor), GAP (GTPase-activating protein) oraz GDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor). Wewnętrzna aktywność GTP-azowa białek Rho jest na niskim poziomie, dlatego aby mogły one przejść ze stanu aktywnego w nieaktywny wymagane są białka GAP, które promują hydrolizę GTP do GDP. Nieaktywne Rho są utrzymywane w cytoplazmie komórki w postaci związanej z białkami GDI, które hamują wymianę GDP na GTP. Ponieważ czynniki GEF ułatwiają zarówno dysocjację GDI, jak również wymianę GDP na GTP ich rola sprowadza się do aktywacji białek Rho. Złożony proces ukierunkowanej lokomocji komórkowej zależy od ściśle zlokalizowanej aktywacji tych białek w określonych regionach cytoplazmy, gdzie

działają one jako „molekularne przełączniki” aktywności białek cytoszkieletu, kluczowe przy tworzeniu wypustek komórkowych.

Dynamiczny proces migracji komórek jest bardzo złożony i wiąże się z ciągłą przebudową sieci cytoszkieletu komórki, która jest niezbędna do ruchu komórkowego i adaptacji do zmian otaczającego środowiska komórki. W szczególności ruch komórkowy potrzebuje szybko aktywowanych i regulowanych w sposób czasowy ścieżek sygnałowych, które pomagają w zapewnieniu komórkowej odpowiedzi na zewnętrzne zmiany. GTP-azy Rho pełnią istotną rolę w regulacji organizacji cytoszkieletu, wpływając zarówno na filamenty aktynowe, jak i mikrotubule. Złożony proces ukierunkowanej lokomocji komórkowej zależy od ściśle zlokalizowanej aktywacji tych białek w określonych regionach cytoplazmy, gdzie działają one jako „molekularne przełączniki” aktywności białek cytoszkieletu, kluczowe przy tworzeniu wypustek komórkowych.

### **3. Podsumowanie i wnioski**

Mechanizmy ruchu komórek poznawane są coraz bardziej szczegółowo, nadal jednak nie znamy odpowiedzi na wiele podstawowych pytań. Dlatego konieczne jest poszukiwanie nowych molekularnych szlaków przekazywania sygnałów oraz scharakteryzowanie białek odpowiedzialnych za ruch komórek. Ich dokładne poznanie i scharakteryzowanie pozwoli na opracowanie nowych celów dla skutecznych terapii farmakologicznych, skierowanych jednocześnie w stronę szlaków przekazywania sygnałów wspólnych dla wszystkich typów ruchu komórek.

### **4. Literatura**

- Bottcher RT, Niehrs C (2005) Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine Reviews* 26: 63–77.
- Charras G, Sahai E (2014) Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15: 813–824.
- Condeelis JS, Wyckoff JB, Bailly M, Pestell R, Lawrence D, Backer J, Segall JE (2001) Lamellipodia in invasion. *Seminars in Cancer Biology* 11: 119–128.
- Devreotes PN, Zigmond SH (1988) Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. *Annual Review of Cell Biology* 4: 649–686.
- Discher DE, Janmey P, Wang Y (2005) Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310: 1139–1143.
- Gupton SL, Anderson KL, Kole TP, Fischer RS, Ponti A, Hitchcock-DeGregori SE, Danuser G, Fowler VM, Wirtz D, Hanein D, Waterman-Storer CM (2005) Cell migration without a lamellipodium: translation of actin dynamics into cell movement mediated by tropomyosin. *Journal of Cell Biology* 168: 619–631.
- Hantash BM, Zhao L, Knowles JA, Lorenz HP (2008) Adult and fetal wound healing. *Frontiers in Bioscience* 13: 51–61.
- Hu CT, Wu JR, Wu WS (2013) The role of endosomal signaling triggered by metastatic growth factors in tumor progression. *Cell Signaling* 25: 1539–1545.
- Kim DH, Provenzano PP, Smith CL, Levchenko A (2012) Matrix nanotopography as a regulator of cell function. *Journal of Cell Biology* 197: 351–360.
- Lauferburger DA, Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84: 359–369.
- Lu P, Weaver VM, Werb Z (2012) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *Journal of Cell Biology* 196: 395–406.
- McKerrow JH, Bhargava V, Hansell E, Huling S, Kuwahara T, Matley M, Coussens L, Warren R (2000) A functional proteomics screen of protease in colorectal carcinoma. *Molecular Medicine* 6: 450–460.
- Montell DJ (2008) Morphogenetic cell movements: diversity from modular mechanical properties. *Science* 322: 1502–1505.

- Mrowietz U, Schwenk U, Maune S, Bartels J, Kupper M, Fichtner I, Schroder JM, Schadendorf D (1999) The chemokine RANTES is secreted by human melanoma cells and is associated with enhanced tumor formation in nude mice. *British Journal of Cancer* 79: 1025–1031.
- Otto O, Rosendahl P, Mietke A, Golfier S, Herold C, Klaue D, Girardo S, Pagliara S, Ekpenyong A, Jacobi A, Wobus M, Topfner N, Keyser UF, Mansfeld J, Fischer-Friedrich E, Guck J (2015) Real-time deformability cytometry: on-the-fly cell mechanical phenotyping. *Nature Methods* 12: 199–202.
- Paluch E, van der Gucht J, Sykes C (2006) Cracking up: symmetry breaking in cellular systems. *Journal of Cell Biology* 175: 687–692.
- Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC (1997) The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *Journal of Cell Biology* 137:1445–1457.
- Pinner S, Sahai E (2008) Imaging amoeboid cancer cell motility in vivo. *Journal of Microscopy* 231: 441–445.
- Rossi D, Zlotnik A (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annual Review of Immunology* 18: 217–242.
- Sternlicht MD, Bergers G (2000) Matrix metalloproteinases as emerging target in anticancer therapy: status and prospects. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 4: 609–633.
- Wilson K, Lewalle A, Fritzsche M, Thorogate R, Duke T, Charras G (2013) Mechanisms of leading edge protrusion in interstitial migration. *Nature Communication* 4: 2896.
- Wolf K, Friedl P (2006) Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *British Journal of Dermatology* 154: 11–15.
- Wolf K, Te Lindert M, Krause M, Alexander S, Te Riet J, Willis AL, Hoffman RM, Figdor CG, Weiss SJ, Friedl P (2013) Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *Journal of Cell Biology* 201: 1069–1084.
- Xu WW, Mezencev R, Kim B, Wang LJ, McDonald J, Sulchek T (2012) Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells. *PLoS One* 7, e46609.
- Zaidel-Bar R, Ballestrem C, Kam Z, Geiger B (2003) Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci* 116: 4605–4613.

## **7. Przechowywanie leków a ich trwałość**

Storage of drugs and their durability

Anna Ploch <sup>(1,2)</sup>, Małgorzata Maciążek-Jurczyk <sup>(1)</sup>, Danuta Pentak <sup>(1)</sup>, Agnieszka Szkudlarek <sup>(1)</sup>, Lidia Szymczak-Mazur <sup>(1)</sup>, Barbara Błońska-Fajfrowska <sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny

Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

<sup>(2)</sup>Katedra i Zakład Podstawowych Nauk Biomedycznych, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Barbara Błońska-Fajfrowska

Ploch Anna: aniaploch@op.pl

Słowa kluczowe: termin ważności, termin przydatności, trwałość leków

### **Streszczenie**

Badania stabilności produktów farmaceutycznych są jednym z ważniejszych etapów procesu badawczo-wdrożeniowego w trakcie wprowadzania nowego produktu na rynek. Zapewniają one utrzymanie jakości, bezpieczeństwa i skuteczności produktu przez cały okres przydatności do spożycia. Badania te uważane są za warunek wstępny przyjęcia i zatwierdzenia jakiegokolwiek produktu farmaceutycznego. Prowadzone są w celu doboru najkorzystniejszych warunków procesu technologicznego, ustalenia warunków przechowywania oraz ustalenia dopuszczalnego okresu przechowywania. W związku z powyższym badania są czasochłonne i generują wysokie koszty. Problem trwałości leku jest nadal aktualny ze względu na to, iż społeczeństwo nie zawsze stosuje się do zaleceń przez producenta warunków przechowywania leków co może mieć poważne skutki dla zdrowia a nawet życia pacjenta.

### **1. Wstęp**

Wprowadzenie nowego produktu leczniczego na rynek to długi i kosztowny proces. Jednym z etapów procesu badawczo-wdrożeniowego jest określenie stabilności leku będącego podstawą do wyznaczenia daty ważności i warunków przechowywania tak aby w całym okresie trwałości lek był skuteczny a przede wszystkim bezpieczny dla pacjenta. W dzisiejszych czasach problem stabilności i trwałości leku związany jest przede wszystkim z narażeniem produktów leczniczych na działanie czynników zewnętrznych jakim lek niejednokrotnie poddawany jest podczas transportu od producenta poprzez magazyny i hurtownie aż po półki apteczne. Bardzo duży wpływ na stabilność leku ma m.in. zbyt wysoka temperatura, wilgotność powietrza, czy też promieniowanie świetlne wywołujące m.in. reakcję hydrolizy, racemizacji, utleniania, wzajemne oddziaływania pomiędzy składnikami preparatu oraz rozkład fotochemiczny w następstwie czego dochodzi do zwiększenia szybkości rozkładu leku oraz skrócenia okresu przechowywania (York 1977; Folb 1990). Dlatego też terminy ważności produktów leczniczych obowiązują tylko wtedy gdy spełnione są określone wymagania dotyczące przechowywania.

### **2. Termin ważności a termin przydatności do spożycia leku**

Termin ważności leku jest jedną z najistotniejszych informacji decydującą o bezpieczeństwie jego stosowania. Zgodnie z definicją, termin ważności jest to okres czasu w którym producent gwarantuje pełną wartość danego produktu leczniczego wraz z adnotacją o warunkach przechowywania. Termin przydatności jest to czas dłuższy od ustawowego 3-letniego okresu odpowiedzialności producenta (Blicharski i in. 1988). W przypadku leków recepturowych nie da się jednoznacznie określić terminu ważności. Można jedynie określić okres przydatności do użycia na podstawie trwałości poszczególnych składników danego preparatu oraz zachodzących interakcji między nimi.

Już 1979 r. Urząd ds. Żywności i Leków (Food and Drug Administration) nakazał aby wszystkie leki na receptę miały termin przydatności do spożycia (lub datę ważności) zamieszczoną bezpośrednio na opakowaniu produktu. Podobne wymagania obowiązują w Unii Europejskiej (Capen i in. 2012). Jednak w Polsce zgodnie z rozporządzeniem Ministra Zdrowia (§ 3 ust. 1 pkt. 9) wymagane jest tylko umieszczenie terminu ważności produktu leczniczego (rok i miesiąc) zarówno na opakowaniu zewnętrznym jak i wewnętrznym np. blisterze.

### **3. Trwałość leku**

Badanie trwałości leku jest złożonym procesem ze względu na udział różnych czynników wpływających na trwałość produktu farmaceutycznego. Czynniki te obejmują stabilność substancji czynnej, oddziaływanie substancji czynnej z substancjami pomocniczymi, proces produkcji, postać leku, rodzaje opakowań oraz warunki środowiska (promieniowanie, temperatura i wilgotność) panujące podczas:

- przechowywania partii leków u producenta
- transportu
- przechowywania w hurtowni
- przechowywania w aptece otwartej lub szpitalnej
- przechowywania w domu pacjenta lub gabinecie lekarza.

Rzeczywista trwałość leku jest to okres w którym lek przechowywany w ściśle określonych warunkach zadanych przez producenta, powinien być zdalny do użytku. Podstawą określenia trwałości produktu leczniczego jest zawartość substancji czynnej wyrażona w miligramach i umieszczona na opakowaniu. Lek uznaje się za trwały jeżeli zawartość substancji czynnej wynosi ponad 90% deklarowanej ilości w określonych warunkach przechowywania, przy czym produkty rozkładu nie są toksyczne a wygląd i zapach pastylki nie uległ zmianie (Allen 2010).

Trwałość rzeczywistą leku rozpatruje się w różnych kategoriach. Wyróżniamy m.in.: trwałość chemiczną, fizyczną, mikrobiologiczną, biofarmaceutyczną, toksykologiczną (Kommanaboyina i in. 1999).

Trwałość chemiczna to jedna z najważniejszych i najprostszych do oceny ilościowej właściwość leku określająca jego przydatność do spożycia. Jest zależna głównie od warunków przechowywania m.in. temperatury, promieniowania świetlnego, wilgotności powietrza itp. W wyniku nieodpowiedniego przechowywania leków czyli w innych warunkach niż te określone przez producenta może dojść do rozkładu substancji czynnej i substancji pomocniczych leku w wyniku m.in. reakcji hydrolizy, utleniania, redukcji, racemizacji, hydratacji i dehydratacji, dekarboksylacji, przegrupowania przestrzennego, czy też dimeryzacji i polimeryzacji (Carstensen i in. 2000). Metodami badawczymi trwałości chemicznej są m.in. metody chromatograficzne (TLC, GC,HPLC), elektroforetyczne (elektroforeza kapilarna), spektroskopowe (NMR, IR, MS), chiralooptyczne (skręcalność optyczna, dichroizm kołowy, dyspersja skręcalności optycznej).

Trwałość fizyczna związana jest z fizycznymi zmianami postaci leku m.in. wyglądem, smakiem, jednorodnością, konsystencją, klarownością roztworu, szybkością rozpuszczania, pH czy też zdolnością do rozpraszania wiązki światła co wpływa na stabilność substancji leczniczej (Carstensen i in. 2000). Powodem braku trwałości fizycznej leku mogą być zmiany:

- wynikające z utleniania się składników leku
- wilgotności preparatu
- konsystencji i lepkości
- struktury krystalicznej
- zabarwienia (Blicharski i in. 1988).

Zmiany te ilościowo są trudniejsze do zidentyfikowania ze względu na ich różnorodność. Metodami badawczymi trwałości fizycznej są m.in. metody optyczne (nieuzbrojone oko, mikroskop), spektroskopowe (m.in. spektroskopia IR), termiczne (termograwimetria, mikrokalorymetria), określenie wielkości cząstek (impaktor, licznik Coultera ).

Na stabilność produktu farmaceutycznego wpływają także zmiany mikrobiologiczne, takie jak wzrost mikroorganizmów w niesterylnie przechowywanych produktach leczniczych i spadek skuteczności działania środków konserwujących/środków bakteriobójczych (Matthews 1999).

Źródłem zakażenia leku mogą być m.in. wyjściowe substancje czynne i pomocnicze, nieodpowiednie opakowania, aparatura stosowana w produkcji substancji leczniczych, zanieczyszczenie powietrza w pomieszczeniach produkcyjnych oraz magazynach, proces technologiczny, sprzyjające rozwojowi drobnoustrojów bakteriobójczych oraz sami pracownicy zatrudnieni przy produkcji leków (Blicharski i in. 1988). Zewnętrznymi objawami świadczącymi o „zepsuciu” się produktu leczniczego pod wpływem zmian mikrobiologicznych są m.in. utworzenie się pleśni, mętnienie i powstanie osadów na preparacie, zmiany zabarwienia i zapachu, jak również tworzenie się gazu w próbkach. Metodami badawczymi trwałości mikrobiologicznej są m.in. badania jałowości i badania czystości mikrobiologicznej.

Trwałość biofarmaceutyczna odnosi się do zmian fizycznych, chemicznych i mikrobiologicznych zachodzących jednocześnie w produkcie leczniczym. Zmiany te mogą być spowodowane m.in. zmianami struktury fizycznej leku przez co dochodzi do twardnienia i nierozpuszczalności pastylek, nietopliwości czopków oraz braku odporności otoczki leku na działanie soków żołądkowych. W związku z powyższym może dojść do niekontrolowanego uwalniania się substancji aktywnej tzn. uwalnia się ona w niewystarczającej ilości bądź też w niewłaściwym czasie i miejscu (Blicharski i in. 1988).

Trwałość toksykologiczna odnosi się do zawartości substancji toksycznych w próbce które nie powinny ulec zmianie w całym okresie trwałości leku. Produkty rozkładu pojawiają się w wyniku nieodpowiedniego przechowywania produktów leczniczych na skutek zachodzących w nich reakcji chemicznych. Są to przede wszystkim produkty rozkładu substancji czynnej, substancji pomocniczych lub obu jednocześnie. Powstałe nowe, toksyczne związki mogą mieć np. o działanie uczulające (Blicharski i in. 1988).

#### **4. Badania trwałości leków**

Określenie trwałości produktu leczniczego jest rutynową procedurą przeprowadzaną na produktach leczniczych. Badania stabilności produktów leczniczych można podzielić na trzy etapy:

1. testowanie stabilności w czasie rzeczywistym (badania długoterminowe)
2. przyspieszone testy stabilności
3. badania pośrednie.

Badania stabilności w czasie rzeczywistym wykonywane są minimum dla 3 serii produktu leczniczego w oryginalnym opakowaniu i składzie przewidzianym do sprzedaży, w warunkach określonej strefy klimatycznej oraz w warunkach zalecanych przez producenta z użyciem tradycyjnych metod spektroskopowych, co wymaga długiego czasu obserwacji i czasochłonnych badań (Blicharski i in. 1988). Czas trwania badań zależy przede wszystkim od stabilności produktu. Polegają one na oznaczaniu zawartości substancji czynnej, substancji pomocniczych pod względem właściwości fizykochemicznych i czystości mikrobiologicznej (Bardel 2015). Podczas testów wyniki zbierane są z określoną częstotliwością w celu określenia linii trendu aby rozróżnić niestabilność leku od błędnego, pojedynczego pomiaru (Anderson i in. 1991). Przez pierwszy rok badania wykonywane są co trzy miesiące, zaś przez kolejne lata co 6 miesięcy. Badania prowadzone są w temperaturze 25°C i wilgotności powietrza 60% RH (wilgotności pokojowej) bądź w temperaturze 30°C i wilgotności 65% RH (Bardel 2015). Wiarygodność uzyskanych wyników można zwiększyć poprzez wprowadzenie do badań materiału referencyjnego o określonej i powszechnie znanej stabilności farmakologicznej. Powyższa analiza obejmuje nie tylko określenie stabilności składników ale również wpływ aparatury badawczej która będzie używana w całym okresie testowania na stabilność badanego związku (Anderson i in. 1991). Zaletą takiego schematu badań jest to, iż analiza rozkładu badanych substancji prowadzona jest w warunkach odpowiadających warunkom w jakich preparat będzie przechowywany. Wadą zaś jest jego czasochłonność. Ponadto nie można przewidzieć stabilności leku po czasie dłuższym niż okres obserwacji. W przypadku gdyby produkt leczniczy okazał się nietrwały wówczas nowe próby jego stabilizacji wymagałyby wprowadzenia kolejnych procedur a to z kolei przedłużyłoby badania o kolejny rok. Wychodząc na przeciw tym rozwiązaniom wprowadzono nową metodę badań - test przyspieszonego starzenia który pozwala znacznie skrócić czas analiz (Bardel 2015).

Testy przyspieszonego starzenia stosuje się już w pierwszych etapach procesu badawczo - wdrożeniowego nowego leku. Badania te polegają na określeniu ilości ciepła potrzebnego do zajścia reakcji rozkładu substancji czynnej lub substancji pomocniczych badanego preparatu (Bardel 2015). Oprócz temperatury, badany jest również wpływ: wilgotności powietrza, promieniowania świetlnego, pH roztworu, czy też rodzaju opakowania na stabilność leku. Testy tego typu zostały zaprojektowane w celu przyspieszenia rozkładu chemicznego i przemian fizycznych pod wpływem zastrzonych warunków temperaturowych 40°C i wilgotności powietrza równej 75% RH. Próbkę do badań pobierane są co 1 miesiąc przez 3 miesiące lub co 3 miesiące przez pół roku. Na podstawie uzyskanych wyników można określić stabilność leku pod wpływem różnych czynników zewnętrznych oraz warunki bezpiecznego przechowywania substancji leczniczych aby w całym okresie przydatności do spożycia nie nastąpiła degradacja poszczególnych składników leku (Kommanaboyina i in. 1999).

Badania pośrednie prowadzone są w celu średniego przyspieszenia rozkładu chemicznego i przemian fizycznych produktu leczniczego w przypadku gdy w badaniach przyspieszonych wykazano ponad 5% zmianę stężenia substancji czynnej, przekroczoną zawartość produktów rozkładu, przekroczone limity pH oraz zaobserwowano zmianę wyglądu i właściwości fizycznych pastylki. Analiza prowadzona jest wówczas co 3 miesiące przez okres 6-12 miesięcy w temperaturze 30°C i wilgotności 65% RH (Bardel 2015).

Dla produktów leczniczych które pośrednio będą przechowywane w temperaturze pokojowej wykonuje się badania stabilności zgodnie z ogólnymi zasadami podanymi powyżej. W przypadku gdy lek jest niestabilny w temperaturze pokojowej, badania stabilności wykonywane są wówczas w obniżonej temperaturze. Badania długoterminowe wykonywane są w temperaturze 5°C przez minimum 12 miesięcy, zaś testy przyspieszone w 25°C w wilgotności 60% RH przez minimum 6 miesięcy. Badania trwałości produktów wymagających przechowywania w zamrażarce w całym okresie przydatności prowadzone są minimum 12 miesięcy w temperaturze -20°C (badania długoterminowe) (Bardel 2015).

## **5. Przechowywanie leku**

Określenie terminu ważności leku poprzedzone jest szeregiem badań prowadzonych na różnym etapie jego syntezy. Data ważności ma istotne znaczenie tylko wówczas, gdy produkt leczniczy lub substancja lekopochodna przechowywana jest w odpowiednich warunkach podanych przez producenta. Informacja zawarta na opakowaniu zewnętrznym bądź ulotce dołączonej do opakowania, iż lek jest trwały np. przez 3 lata, nie znaczy, że jego stabilność nie ulegnie zmianie jeśli będzie on przechowywany w nieodpowiednich warunkach np. w wysokiej temperaturze, czy też w pomieszczeniu o podwyższonej wilgotności powietrza.

W związku z powyższym, producent powinien także brać pod uwagę fakt, iż jego zalecenia nie zawsze są przestrzegane np. w trakcie transportu z hurtowni do apteki jak również w domu chorego. Pomimo, iż w niektórych przypadkach brak jest informacji na temat sposobu przechowywania preparatu farmaceutycznego, warunki w jakich jest przechowywany powinny zapewnić ochronę przed przegrzaniem, wychłodzeniem czy też nadmierną wilgocią. W związku z czym każdy lek, jeśli nie ma podanych dokładnych zaleceń, powinien być przechowywany w temperaturze pokojowej (15-25°C), w pomieszczeniu o ograniczonej wilgotności oraz wolnym od promieniowania świetlnego w celu zabezpieczenia preparatu przed bezpośrednim działaniem światła słonecznego (Bajaj i in. 2012).

Nieodpowiednia temperatura przechowywania leków ma ogromny wpływ na ich trwałość. Zbyt wysoka temperatura obniża trwałość chemiczną, fizyczną i biologiczną, zaś zbyt niska temperatura wpływa niekorzystnie na stabilność preparatu leczniczego np. w wyniku krystalizacji substancji czynnej z roztworów nasyconych lub będących na granicy nasycenia w zalecanych przez producenta warunkach przechowywania. Jednym z przykładów jest insulina która ze względu na swoją trwałość powinna być przechowywana w lodówce. W temperaturze powyżej 10°C szybkość rozkładu insuliny znacznie wzrasta, zaś przechowywanie jej w temperaturze poniżej punktu jej zamarzania (poniżej 0°C) powoduje wydzielenie się wody i jej krystalizację co przyczynia się do

zwiększenia stężenia fenolu (środka bakteriostatycznego) w roztworze a następnie jej rozkładu (Blicharski i in. 1988).

Przechowywanie leków w pomieszczeniach o wilgotności względnej powyżej 60% RH również wpływa negatywnie na trwałość substancji czynnej. Odpowiednim zabezpieczeniem przed niekorzystnym wpływem wilgoci z powietrza jest właściwy dobór materiału z którego wykonano opakowanie oraz jego szczelne zamknięcie. W przypadku związków higroskopijnych istotne jest ich przechowywanie w pojemnikach szczelnie zamykanych z dodatkowo umieszczoną wewnątrz opakowania substancją pochłaniającą wilgoć (Blicharski i in. 1988).

## **6. Rodzaje opakowań**

Nieodpowiedni dobór opakowania oraz tworzywa z którego zostało wykonane zmniejsza stabilność nawet najtrwalszej substancji czynnej. W związku z powyższym, wybór odpowiedniego rodzaju materiału do produkcji opakowań oraz jego wpływ na trwałość produktu leczniczego przez ochronę przed niekorzystnymi czynnikami zewnętrznymi takimi jak: światło słoneczne, wilgoć, tlen oraz inne czynniki destrukcyjne, powinien być poprzedzony szeregiem badań. Pomiędzy lekiem a materiałem z jakiego zostało wykonane opakowanie mogą zachodzić reakcje o różnym charakterze m.in.:

- migracja pierwiastków z materiału opakowania do leku (najczęściej występującego w postaci roztworu)
- sorpcja substancji czynnej na powierzchni wewnętrznej opakowania
- zmiana wyglądu opakowania (np. w wyniku korozji) pod wpływem substancji leczniczej
- gromadzenie się produktów reakcji ubocznych na powierzchni zetknięcia się opakowania z warstwą leku.

W związku z powyższym opakowanie leków najczęściej wykonuje się z takich materiałów jak: szkło, metal, tworzywa sztuczne a zatyczki produkuje się z gumy (Blicharski i in. 1988).

## **7. Podsumowanie**

W dzisiejszych czasach badanie stabilności produktów leczniczych jest jednym z najważniejszych elementów proceduralnych w trakcie wdrażania nowego leku na rynek. Wymaga się od producenta ustalenia odpowiedniego składu substancji aktywnych, doboru składu substancji pomocniczych i określenie parametrów procesu technologicznego. Każdy preparat wprowadzony na rynek powinien być skuteczny i bezpieczny dla pacjenta przez cały okres ważności w którym jest dopuszczony do użytku. Konsekwencją leczenia pacjentów lekami częściowo zdegradowanymi może być prawdopodobieństwo zmniejszenia odpowiedzi terapeutycznej która może być trudna do rozpoznania. Jeśli jednak degradacja ta jest znaczna, zażycie leku może mieć poważne konsekwencje – może doprowadzić do oporności drobnoustrojów i/lub niepowodzenia leczenia a w najgorszym przypadku do śmierci. Rolą farmaceuty przed wydaniem leku powinno być ostrzeżenie i uświadamianie pacjentów o stosowaniu się do informacji o warunkach przechowywania produktu farmaceutycznego jak zostało to umieszczone na opakowaniu zewnętrznym i ulotce przez producenta.

## **8. Literatura**

- Allen LV (2010) *Pharmaceutical Dosage Form And Drug Delivery System Design*, Chapter 9, Section II, Toledo.
- Anderson G, Scott M (1991) Determination of product shelf life and activation energy for five drugs of abuse. *Clin. Chem.* 37: 398–402.
- Bajaj S, Singla D, Sakhuja N (2012) Stability Testing of Pharmaceutical Products. *J. App. Pharm. Sci.* 02(03): 129–138.
- Ballereau F, Prazuck T, Schrive I (1997) Stability of essential drugs in the field: Results of a study conducted over a two-year period in Burkina Faso. *Am. J. Trop. Med.* 57: 31–36.
- Bardel A (2015) Życie produktu leczniczego. *LAB Laboratoria, Aparatura, Badania.* 20(3): 20–22.



- Blicharski J, Brandys J, Cieszyński T pod red. Krówczyński L, Danek A (1988) Zarys farmacji klinicznej. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 86–121.
- Capen R, Christopher D, Forenzo P, Ireland C, Liu O, Lyapustina S, O'Neill J, Patterson N, Quinlan M, Sandell D, Schwenke J, Stroup W, Tougas T (2012) On the shelf life of pharmaceutical products. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 13(3): 911–918.
- Carstensen JT, Rhodes CT (1993) Rational Policies for Stability Testing. *Clin. Res. Drug Reg. Affairs.* 10: 177–185.
- Folb P (1990) Comments on expired medicines (letter) by Barmania A. *S. Afr. Med. J.* 78: 218.
- Harvard Health Publications, *Drug Expiration Dates - Do They Mean Anything*, Boston 2003.
- Kiron SS, Shirwaikar A, Saritha M, Rajagopal PL, Sreejith K (2013) Influence of storage condition on the shelf life of amoxicillin tablets. *Pharmacy.* 64: 19146–19150.
- Kommanaboyina B, Rhodes CT (1999) Trends in Stability Testing with Emphasis on Stability During Distribution and Storage. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25: 857–867.
- No authors listed (1977) Storage and shelf-life of drugs: When is it important? *Drug Ther. Bull.* 15, 81–83.
- Matthews RB (1999) Regulatory Aspects of Stability Testing in Europe. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25: 831–856.
- York P (1997) The shelf life of some antibiotic preparations stored under tropical conditions. *Pharmazie.* 32: 01–104.

Praca zrealizowana w ramach umowy statutowej **KNW-1-030/N/7/O** i projektu badawczego **NCN UMO-2015/19/B/NZ9/03348**

## 8. Końcowe produkty glikacji białek – cichy zabójca

Advanced Glycation End-products – silent killer

Ploch Anna, Szkudlarek Agnieszka, Pentak Danuta, Maciążek-Jurczyk Małgorzata

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Agnieszka Szkudlarek: aszkudlarek@sum.edu.pl

Słowa kluczowe: reakcja Maillarda, AGEs, inhibitory glikacji białek

### Streszczenie

Białka odgrywają decydującą rolę w niemal wszystkich procesach biologicznych. Są zasadniczymi elementami metabolicznymi i strukturalnymi komórek, tkanek i narządów każdego żywego organizmu. Na etapie obróbki posttranslacyjnej aminokwasy białek ulegają m.in. glikacji. Ta strukturalna modyfikacja może wpływać na właściwości chemiczne i fizyczne białek, na ich stabilność oraz aktywność, a zatem na pełnione przez nie funkcje fizjologiczne. Zaburzenia strukturalne białek indukowane są przez stany patologiczne. Szczególną rolę w powstawaniu patologii, poczynając od zaburzeń na poziomie molekularnym, poprzez oddziaływania komórkowe, a kończąc na zmianach narządowych, przypisuje się tzw. końcowym produktom zaawansowanej glikacji białek (*Advanced Glycation End-products*, AGEs). Glikacja, znana również jako *reakcja Maillarda*, jest wieloetapowym procesem zachodzącym spontanicznie w żywych organizmach. W zdrowym organizmie większość AGEs ulega rozpadowi i eliminacji. W warunkach długotrwałe utrzymującego się stanu hiperglikemii dochodzi do nasilenia procesu glikacji. W konsekwencji szkodliwe produkty gromadzące się w toku przemian metabolicznych biorą udział w etiopatogenezie wielu chorób m.in. przewlekłych powikłań cukrzycowych o charakterze mikro- i makroangiopatii, czy też procesów degeneracyjnych związanych z wiekiem.

### 1. Wstęp

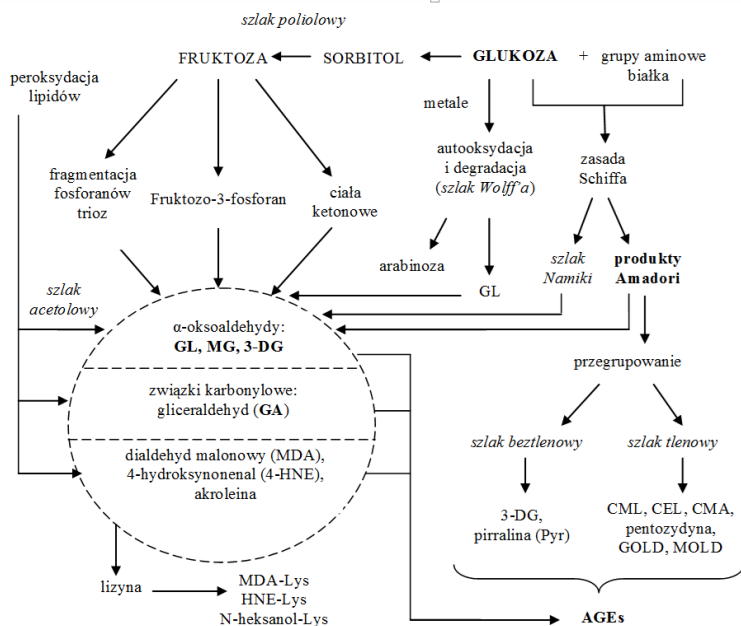
Przewlekle utrzymujący się podwyższony poziom cukru we krwi prowadzi do uszkodzenia, niewydolności oraz dysfunkcji wielu narządów. Jedną z ważniejszych przemian biochemicznych, która odgrywa dominującą rolę w rozwoju stanów patologicznych, w tym powikłań cukrzycowych o charakterze mikro- i makroangiopatii, jest glikacja białek (*reakcja Maillarda*). Stanowi ona szereg kilkusetetapowych i skomplikowanych reakcji, w wyniku których powstają zaawansowane (końcowe) produkty glikacji (*Advanced Glycation Endo-products*, AGEs). AGEs odpowiedzialne są za uszkodzenia struktur komórkowych i tkankowych. Prowadzą do wystąpienia szeregu konsekwencji zdrowotnych przyczyniających się do spadku jakości życia oraz przedwczesnego starzenia się organizmu. Glikacji ulegają białka o długim okresie półtrwania (kolagen, krystalina soczewki oka), ale również te o krótszym, m.in. hemoglobina i albumina, a także krótkożyjące, np. enzymy. Reakcja może zachodzić także z grupami aminowymi lipidów i kwasów nukleinowych (Goodarzi i in. 2010). Procesowi glikacji *in vivo* często współtowarzyszy proces oksydacji, który zachodzi intensywnie w warunkach stresu oksydacyjnego.

### 2. Opis zagadnienia i przegląd literatury

#### 2.1 Molekularny mechanizm glikacji białek w organizmie

W układach biologicznych proces glikacji obejmuje trzy główne etapy: fazę początkową, etap pośredni oraz stadium późne (końcowe). Pierwszy etap glikacji zapoczątkowuje reakcja kondensacji wolnej grupy karbonylowej cukrów redukujących z pierwszorzędową grupą aminową reszty aminokwasowej białka z wytworzeniem N-podstawionej aldozyloaminy. Produkt kondensacji szybko traci wodę i jest przekształcany w odwracalną, labilną zasadę Schiffa (aldiminę). W ciągu kilku tygodni związek ten ulega wewnątrzcząsteczkowemu przegrupowaniu z wytworzeniem trwałego i częściowo odwracalnego produktu reakcji Amadoriego (ARP): 1-amino-1-deoksyketozy

(ketoaminy). Ketozy, takie jak fruktoza, reagują z aminami z wytworzeniem aminoaldoz. Jest to reakcja Heyns'a. Związkami pośrednimi tej reakcji są iminy. Aminoaldozy są niezbyt stabilne i łatwo wchodzą w reakcje chemiczne, tworząc produkty Amadori (Rondeau i Bourdon 2011). Produkty tych reakcji zwane wczesnymi, mogą przechodzić w siebie nawzajem, a stan równowagi ustala się po około 28 dniach (Thornalley 2005). W etapie pośrednim produkty Amadori, czyli niepożądane związki z wolną grupą karbonylową reaktywną chemicznie, poprzez utlenianie i reakcje dehydratacji, mogą ulec rozkładowi do związków  $\alpha$ -dikarbonylowych ( $\alpha$ -oksoaldehydów)<sup>1</sup>: glioksalu (GL), metyloglioksalu (MG), 3-deoksyglukozonu (3-DG) i gliceraldehydu (GA). Działają one jako propagatory reakcji, ponownie reagując z wolnymi grupami aminowymi białka (Thornalley 2005; Nawale i in. 2006). Ze względu na swoją wysoką reaktywność powodowaną brakiem struktur cyklicznych oraz stosunkowo małe rozmiary, związki dikarbonylowe odpowiedzialne są za powstawanie większości AGEs. Jedną z głównych konsekwencji modyfikacji białka przez aktywne dikarbonylowe intermediaty glikacji jest tworzenie między- i wewnątrzcząsteczkowych wiązań krzyżowych pomiędzy białkami (*cross-links*), co prowadzi do zaburzeń w ich funkcjonowaniu i rozwoju powikłań o charakterze mikro- i makroangiopatii. W późnym etapie glikacji produkty Amadori oraz prekursorzy AGEs w wyniku *reakcji Maillarda* ulegają oksydacji, dehydratacji, fragmentacji i kondensacji z innymi grupami aminowymi, co w konsekwencji prowadzi do formowania się stabilnych końcowych produktów zaawansowanej glikacji (*Advanced Glycation Endo-products*, AGEs). Ponadto poszczególne cukry redukujące mają różną zdolność reagowania z grupami aminowymi białek. Okazuje się, że fruktoza częściej spożywana przez pacjentów z cukrzycą jako zamiennik glukozy oraz galaktoza są *in vitro* bardziej reaktywne od glukozy (Szkudlarek i in. 2016; Ledesma-Osuna i in. 2008). Stwierdzono, że znacznie mniej reaktywne od pentoz są heksozy, natomiast od monosacharydów mniejszą reaktywność wykazują oligosacharydy. Ryc. 1. przedstawia szlaki metaboliczne prowadzące do tworzenia końcowych produktów glikacji AGEs.



**Ryc. 1.** Źródła dikarbonylowych prekursorów glikacji odpowiedzialnych za powstawanie AGEs *in vivo* (Nawale i in. 2006).

<sup>1</sup> GL powstaje w wyniku oksydacyjnej fragmentacji zasady Schiffa w szlaku Namiki, autoutlenianiu glukozy katalizowanym przez metale (szlak Wolff'a) lub na drodze peroksydacji lipidów w szlaku acetolowym. 3-DG powstaje w wyniku nieoksydacyjnej fragmentacji i hydrolizy produktów Amadori, bądź tworzy się z fruktozo-3-fosforanu – intermediatu szlaku polioliowego, w którym glukoza redukowana jest do sorbitolu przez reduktazę aldozy. Degradacja 3-DG powoduje powstanie MG i GA na drodze kondensacji retro-aldolowej (Nawale i in. 2006).

## 2.2 Końcowe produkty zaawansowanej glikacji – charakterystyka

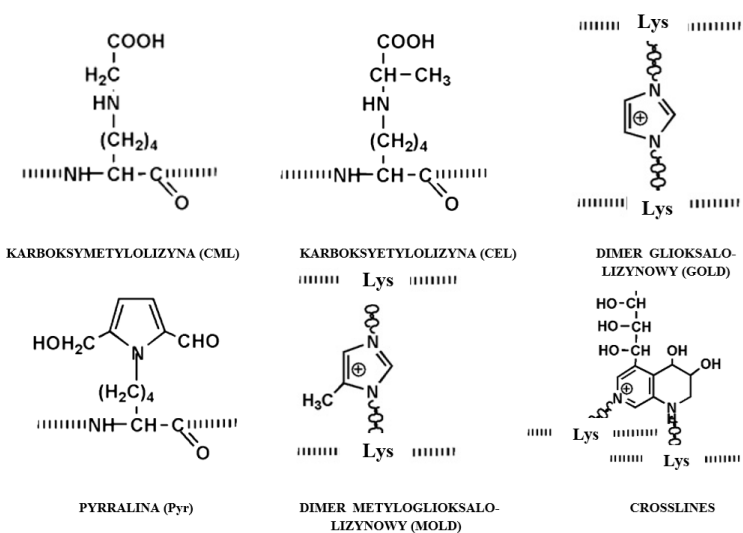
Biorąc pod uwagę zróżnicowane mechanizmy powstawania, nie jest zaskakujące, że AGEs stanowią heterogenną mieszaninę związków o różnych masach cząsteczkowych i charakterystycznych właściwościach. Mogą występować jako małowielkocząsteczkowe (Low Molecular Weight AGEs, LMW-AGEs) oraz wielkocząsteczkowe (High Molecular Weight AGEs, HMW-AGEs), co wykryto w osoczu osób z przewlekłą niewydolnością nerek (PNN) (Sharp i in. 2003). Kluczową cechą końcowych produktów glikacji jest zdolność wchodzenia w reakcje krzyżowe z innymi białkami zaburzając ich strukturę i funkcje. Białka zmodyfikowane przez AGEs mogą być bardziej odporne na degradację enzymatyczną, co dodatkowo zwiększa miejscowe nagromadzenie AGEs w tkankach. Końcowe produkty glikacji poprzez wiązanie do specyficznych receptorów (Receptor for Advanced Glycation End-Products, RAGE) zlokalizowanych na powierzchni wielu typów komórek (m.in. na fagocytach, hepatocytach, komórkach śródbłonna i mięśni gładkich ściany naczyń, komórkach układu nerwowego) aktywują wewnętrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne prowadzące do tworzenia m.in. reaktywnych form tlenu (Yamagishi 2011). Wykazano również, że interakcja AGEs-RAGE aktywuje jądrowy czynnik transkrypcyjny NK- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B), co wpływa na ekspresję genów odpowiedzi zapalnej (np. cytokin) i powoduje przewlekłe uszkodzenia praktycznie każdej tkanki w organizmie. AGEs mogą być również klasyfikowane pod względem zdolności do wykazywania fluorescencji oraz możliwości tworzenia wiązań poprzecznych między białkami (Nawale i in. 2006). Do pierwszej klasy związków – sieciujących oraz wykazujących zdolność absorpcji i fluorescencji zalicza się m.in. pentozydinę. W skład pentozydyny wchodzi pierścień imidazolo-(4,5b)-pirydynowy warunkujący jej zdolności do świecenia. Reaktywne formy tlenu, zwłaszcza rodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ) i rodnik wodorotlenowy ( $\cdot OH$ ) odgrywa istotną rolę w jej tworzeniu (Khan i in. 2007). Pentozydina stanowi wskaźnik do oceny uszkodzenia tkanki pod wpływem glikacji. Powoduje powstawanie wiązań poprzecznych między resztami argininy (Arg) i lizyny (Lys) w kolagenie. Może być obecna w surowicy krwi zarówno w postaci wolnej (10%), jak i związanej z albuminą (90%). Zawartość pentozydyny rośnie w tkance wraz z wiekiem. Druga klasa związków – niefluorescencyjne, sieciujące AGEs są głównym czynnikiem prowadzącym do powstawania in vivo wiązań krzyżowych białko-białko (cross-links). Wśród nich najlepiej poznaną grupą związków są imidazolowe struktury sieciujące, w tym pochodne dimeru glioksalo-lizynowego (GOLD) oraz dimeru metyloglioksalo-lizynowego (MOLD). Obecność tych związków stwierdzono w białku soczewki i surowicy ludzkiej (Wu i in. 2011). Trzecia klasa to niefluorescencyjne, niesieciujące struktury AGEs, które działają jak biologiczne ligandy receptora, inicjując sygnalizację komórkową i indukując stres oksydacyjny w tkankach. Do grupy tej należą: pyrrolina (Pyr), N $\epsilon$ -(karboksymetylo)lizyna (CML), N $\epsilon$ -(karboksyetylo)lizyna (CEL) oraz imidazolon z 3-deoksyglukazonu (3-DG), metyloglioksalu (MG) i glioksalu (GL) (Ahmed i in. 2005). Przykładowo, CML ze względu na silną zależność od tlenu oraz pośrednictwo rodnika hydroksylowego w jej powstawaniu (autooksydacyjna glikacja) jest uważana za marker stresu oksydacyjnego związanego z reakcjami utleniania węglowodanów i lipidów oraz odległych uszkodzeń białek w procesach starzenia się, miażdżycy i cukrzycy. CML jest rozprowadzana w różnych tkankach organizmu, takich jak surowica, kolagen skóry i nerki (Wu i in. 2011). Do końcowych produktów glikacji zalicza się również karboksymetyloargininę (CMA), karboksymetylocysteinę (CMC) oraz karboksyetylocysteinę (CEC). Obecność CMA stwierdzono w kolagenie, natomiast CMC i CEC zidentyfikowano w białkach osocza diabetyków. Niektórzy autorzy dzielą AGEs na nietoksyczne (CML, CEL, Pyr) oraz na toksyczne AGEs, które zwykle wywodzą się z aldehydu glikolowego lub gliceraldehydu (Huijberts i in. 2008).

Ryc. 2 przedstawia struktury chemiczne głównych AGEs pochodzących od reszt lizyny (Lys) i reszt argininy (Arg) (Rondeau, Bourdon 2011).

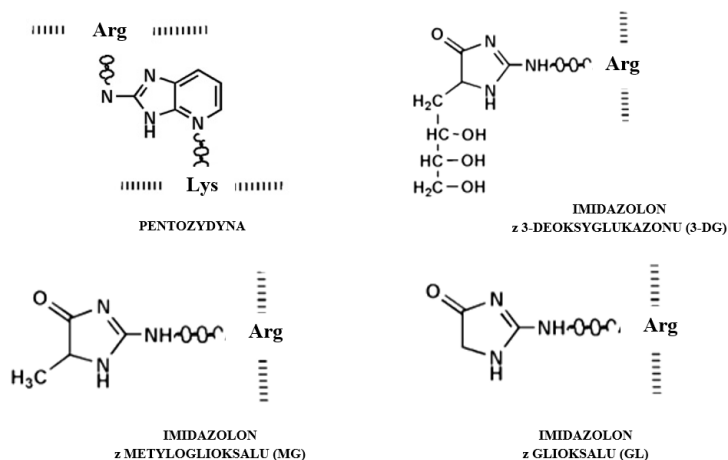
Całkowitą pulę AGEs w organizmie stanowią endogenne związki powstające zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz komórek (pre-melanoidyny) oraz egzogenne AGEs, czyli MRP (*Maillard Reaction Products*) pochodzące z pokarmu lub używek (melanoidyny) (Uribarri i in. 2010). Według Sebecová i wsp. (Sebecová i in. 2000) udział egzogennych AGEs w całkowitej puli nie jest duży, a jako związki odporne na enzymatyczną i chemiczną hydrolizę są źle wchłaniane z przewodu pokarmowego. Z kolei Ames (Ames 2007) stwierdził, że redukcja ilości przyjmowanych MRP

proceeds to a decrease in AGEs in circulation. The level of glycation products in the body depends not only on the rate of their production, but also on the rate of removal from the body. In homeostasis, they undergo proteolytic degradation in lysosomes of cells. Degradation products (i.e. free AGEs) are released into circulation and excreted in urine. A certain amount of AGEs can be removed from circulation by the liver – Kupffer cells and sinusoidal cells of this tissue. However, most of them do not undergo degradation, but accumulate in various tissues. Excessive accumulation in proteins, cytoplasmic, lipid and nucleic acids leads to the formation of oxidative stress and carbonyl stress and the formation of crosslinks against AGEs, as well as to other destructive processes for cells (Zuwała-Jagiello 2009). Additionally, AGEs cause conformational changes of proteins and the formation of protein crosslinks and peptides leading to the formation and deposition of insoluble deposits, the result of which is the loss of properties and disturbance of functions (Szkudlarek et al. 2016; Basta 2008; Szkudlarek et al. 2017).

a)



b)



**Ryc. 2.** Struktury chemiczne głównych produktów glikacji białek (AGEs) pochodzące od **a)** reszt lizyny (Lys), **b)** reszt argininy (Arg) (Rondeau, Bourdon 2011).

### 2.3 Inhibitory końcowych produktów glikacji białek

Jako inhibitory glikacji badane są związki pochodzenia naturalnego i syntetycznego o zróżnicowanych mechanizmach działania (Rahbar 2007). Do znanych substancji zapobiegających tworzeniu się AGEs należą: przeciwutleniacze, m.in. witamina C i E ( $\alpha$ - tokoferol), karotenoidy ( $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten, likopen, luteina, zeaksantyna), rutyna, algi *Chlorella*, zielona herbata, czosnek, drożdże selenowe, które redukują niekorzystne skutki działania reaktywnych form tlenu i azotu na organizm (Rahbar 2007; Babu i in. 2007); związki pułapujące lub zapobiegające powstawaniu produktów Amadori (m.in. witamina B<sub>6</sub>) (Wu i in. 2011); związki wiążące lub zmniejszające produkcję reaktywnych związków dikarbonylowych, m.in. aminoguanidyna, pirydoksamina oraz karnozyna i jej pochodne; związki przerywające wiązania krzyżowe białko-AGEs, m.in. bromek fenylotiazolowy (PTB), chlorek 4,5-dimetylo-3-(2-okso-2-fenilo-etylo)-tiazolu (ALT-711), 4,40-(2-chloro-fenilo-ureid (LR-90)) (Wu i in. 2011; Radoi i in. 2012); związki obniżające poziom AGEs poprzez hamowanie ich wewnątrzkomórkowej syntezy, m.in. benfotiamina (pochodna witaminy B<sub>1</sub> (tiaminy), tenilsetam, aspiryna oraz desferroksamina i klioichinol lub ich wiązanie (rozpuszczalny receptor dla zaawansowanych, końcowych produktów glikacji – sRAGE, który zapobiega interakcji AGEs z RAGE) (Radoi i in. 2012). Wnikliwym badaniom poddaje się możliwość hamowania powstawania AGEs przez obecnie stosowane leki przeciwcukrzycowe, takie jak metformina (dimetylowa pochodna biguanidu), czy też stosowane w leczeniu powikłań cukrzycowych leki z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny (ACEI), antagonistów receptora angiotensyny II (ARB) oraz statyny (Radoi i in. 2012; Reddy i in. 2006). ACEI oraz ARB mają udowodnione działanie hamujące powstawanie AGEs w warunkach *in vitro*, silnie chelatują jony metali przejściowych i izolują RFT (Reddy i in. 2006). Cerywastatyna hamuje sygnał przekazywany przez aktywne receptory RAGE, zmniejsza stężenie karboksymetylolizyny poprawiając stan układu krążenia u diabetyków. Atorwastatyna przywraca właściwy poziom glutationu, zwiększa ekspresję sRAGE i hamuje nadmierną ekspresję RAGE (Radoi i in. 2012). Do inhibitorów AGEs należą również cynk i nanocząstki złota, jednak ich mechanizmy hamujące nie zostały dotąd dokładnie poznane (Wu i in. 2011). Ju-Wen i Chiu-Lan (Ju-Wen, Chiu-Lan 2009) wykazali przeciwiglikacyjny wpływ ekstraktu polifenolowego pozyskanego z gruszi właściwej (*Psidium guajava L.*). W doświadczeniach *in vitro* ekstrakt z liści gruszi istotnie zmniejszał zawartość  $\alpha$ -dikarbonyli (o 95%), jak również obecność AGEs oznaczanych metodą fluorescencyjną (o 70%). Doświadczenia, w których analizowano właściwości polifenoli zawartych w badanym ekstrakcie (kwas galusowy, ferulowy, chlorogenowy, kawowy oraz flawonoidy – rutyna, kwercetyna, kemferol) potwierdziły ich przeciwiglikacyjne właściwości. Piśmiennictwo podaje, iż zawarty w melisie lekarskiej (*Melissa officinalis L.*) kwas rozmarynowy silnie hamuje proces powstawania AGEs (Miroliaei i in. 2011). W badaniach *in vitro* ekstrakt z melisy istotnie obniżał intensywność fluorescencji białka zawartego w poinkubacyjnym roztworze BSA i glukozy. Technika dichroizmu kołowego potwierdziła również jego ochronny wpływ na strukturę drugorzędową albuminy. Ponadto istnieją dowody na obecność enzymów powodujących proces odwrotny do glikacji, czyli deglikację. Ich obecność stwierdzono u kręgowców, bakterii i grzybów (Monnier 2005).

### 3. Podsumowanie

Wobec spostrzeżeń sugerujących udział AGEs w etiopatogenezie wielu chorób, m.in. miażdżycy, amyloidozy, choroby Alzheimera,  $\beta_2$  mikroglobulinemii, katarakty, reumatoidalnego zapalenia stawów, marskości wątroby, mocznicy, zwłóknienia płuc i innych, zahamowanie tworzenia AGEs poprzez zastosowanie substancji – inhibitorów AGEs jest obiecującym celem terapeutycznym. Ponadto stosowanie diety ubogiej w białka i tłuszcze zwierzęce oraz ograniczenie spożycia sacharozy okazuje się być najprostszym środkiem zapobiegającym glikacji białek, która przyczynia się do spadku jakości życia i przedwczesnego starzenia się organizmu.

#### 4. Literatura

- Ahmed N, Babaei-Jadidi R, Howell SK et al (2005) Glycated and oxidized protein degradation products are indicators of fasting and postprandial hyperglycemia in diabetes. *Diabetes Care* 28: 2465–2471.
- Ames JM (2007) Evidence against dietary endproducts being a risk to human health. *Mol Nutr Food Res* 51(9): 1085–1090.
- Babu PVA, Sabitha KE, Srinivasan P et al (2007) Green tea attenuates diabetes induced Maillard-type fluorescence and collagen cross-linking in the heart of streptozotocin diabetic rats. *Pharmacol Res* 55: 433–440.
- Basta G (2008) Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis* 196: 9–21.
- Goodarzi MT, Navidi AA, Rezaei M et al (2010) Oxidative damage to DNA and lipids: correlation with protein glycation in patients with type 1 diabetes. *J Clin Lab Anal* 24 (2): 72–76.
- Huijberts M, Schaper N, Schalkwijk C (2008) Advanced glycation end products and diabetic foot disease. *Diabetes Metab Res Rev* 24 (1): 19–24.
- Ju-Wen W, Chiu-Lan H (2009) Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. *Food Chem* 113:78–84.
- Khan MWA, Rasheed Z, Khan WA et al (2007) Biochemical, biophysical and thermodynamic analysis of in vitro glycated human serum albumin. *Biochemistry* 72 (2): 146–152.
- Ledesma-Osuna AI, Ramos-Clamont G, Vázquez-Moreno L (2008) Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. *Acta Bioch Pol* 55(3): 491–497.
- Miroliaei M, Hhazaei S, Moshkelgosha S et al (2011) Inhibitory effects of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract on the formation of advanced glycation end products. *Food Chem* 129: 267–271.
- Monnier VM (2005) Bacterial enzymes that can deglycate glucose- and fructose-modified lysine. *Biochem J* 392: 263–269.
- Nawale RB, Mourya VK, Bhise SB (2006) Non-enzymatic glycation of proteins: a cause for complication in diabetes. *Indian Biochem Biophys* 43: 337–344.
- Radoi V, Lixandru D, Mohora M et al (2012) Advanced Glycation End Products in diabetes mellitus: mechanism of action and focused treatment. *Proc Rom Acad* 1: 9–19.
- Rahbar S (2007) Novel inhibitors of glycation and AGE formation. *Cell Biochem Biophys* 48(2-3): 47–57.
- Reddy VP, Beyaz A (2006) Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discovery Today* 11(13-14): 646–654.
- Rondeau P, Bourdon E (2011) The glycation of albumin: structural and functional impacts. *Biochimie* 93: 645–658.
- Sebcová K, Krajčovicová-Kudlacková M, Schinzel R et al (2000) Plasma levels of advanced glycation end products in healthy, long-term vegetarians subjects on a western mixed diet. *Eur J Nutr* 44: 129.
- Sharp PS, Rainbow S, Mukherjee S (2003) Serum levels of low molecular weight advanced glycation end products in diabetic subjects. *Diabet Med* 20: 575–579.
- Szkudlarek A, Sułkowska A, Maciążek-Jurczyk M et al (2016) Effects of non-enzymatic glycation in human serum albumin. Spectroscopic analysis. *Spectrochim Acta A – Mol Biomol Spectroscopy* 152: 645–653.
- Szkudlarek A, Maciążek-Jurczyk M, Chudzik M et al (2016) Alteration of human serum albumin tertiary structure induced by glycation. Spectroscopic study. *Spectrochim Acta A – Mol Biomol Spectroscopy* 153: 560–565.
- Szkudlarek A, Pentak D, Ploch A et al (2017) Effect of Temperature on Tolbutamide Binding to Glycated Serum Albumin. *Molecules* 22: 569, doi:10.3390/molecules22040569.
- Thornalley PJ (2005) Dicarbonyl intermediates in the Maillard reaction. *Ann N Y Acad Sci* 1043: 111–117.

- Uribarri J, Woodruff S, Goodman S et al (2010) Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J Am Diet Assoc* 110: 911–916.
- Wu CH, Huang SM, Lin JA et al (2011) Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs. *Food Funct* 2: 224–234.
- Yamagishi S (2011) Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Exp Gerontol* 46: 217–224.
- Zuwała-Jagiełło J (2009) Terapia chorób z udziałem końcowych produktów zaawansowanej glikacji w ich patogenezie. *Pol Merk Lek XXVII*: 152–158.



## **9. Charakterystyka metamfetaminy i amfetaminy oraz wybrane sposoby ich wykrywania w próbkach biologicznych**

Characteristic of methamphetamine and amphetamine and selected methods of their detection in biological samples

Rutecka Sandra<sup>(1)</sup>, Kukawka Rafał<sup>(1,2)</sup>, Śmiglak Marcin<sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup>Pracownia Chemii i Technologii Polimerów Nieorganicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

<sup>(2)</sup>Poznański Park Naukowo Technologiczny, Fundacja Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Opiekun naukowy: dr hab. inż. Marcin Śmiglak

Rutecka Sandra: san-rut@wp.pl

Słowa Kluczowe: chromatografia, mikroekstrakcja, narkotyki

### **Streszczenie**

Początkowo amfetamina i metamfetamina wykorzystywane były w wielu dziedzinach m.in. jako leki w terapii ADHD czy środki odchudzające, natomiast ze względu na wywoływanie długotrwałego efektu pobudzenia oraz ogromny przyrost energii obecnie używane są jako środki odurzające. W związku z tym pojawiła się potrzeba efektywnego i szybkiego wykrywania ich zawartości w próbkach biologicznych, takich jak mocz, ślina czy krew. Do głównych metod analizy pozostałości narkotyków w takich próbkach należą chromatografia gazowa oraz wysokosprawną chromatografia cieczowa, które umożliwiają analizę poszczególnych składników po uprzednim przygotowaniu próbki. W zależności od rodzaju próbek do ich przygotowania stosuje się techniki ekstrakcyjne takie jak SPME (mikroekstrakcja do fazy stałej), DLLME (dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz), SDME (mikroekstrakcja do pojedynczej kropli). Prezentowany artykuł dotyczy będzie charakterystyki dwóch popularnych narkotyków oraz ich głównych metod wykrywania w oparciu o dostępną literaturę.

### **1. Wstęp**

Narkotyki są to substancje pochodzenia roślinnego oraz syntetycznego, których zażywanie może prowadzić do uzależnienia fizycznego jak i psychicznego. Narkotyki, zwane substancjami odurzającymi, należą do grupy środków psychoaktywnych, silnie oddziałujących na ośrodkowy układ nerwowy. Wpływają na ludzki stan świadomości, między innymi na odbiór i ocenę bodźców zewnętrznych. Obecnie substancje te stanowią duże zagrożenie zarówno dla niepełnoletnich jak i dorosłych. Wśród przyczyn sięgania po narkotyki wymienia się m. in. czynniki makrospołeczne (bezrobocie, stopień przestępczości), czynniki genetyczne, deficyty rozwojowe (np. niska odporność na stres, nadpobudliwość, agresja), stosunek do szkoły i nauki (niepowodzenia w nauce, atmosfera w szkole) oraz cechy charakteru (impulsywność, buntowniczość). Z roku na rok w Europie zwiększa się liczba osób sięgających po narkotyki. Do jednych z najbardziej popularnych należą: amfetamina i metamfetamina. Polska podobnie jak inne kraje (Holandia, Belgia, Anglia) jest ich czołowym eksporterem i producentem (Krawczyk 2015). W ubiegłym roku, zgodnie z raportem EMCDDA pochodnych amfetaminy używało ponad 1,3 mln osób (Goulão i Götz 2015)

### **2. Opis zagadnienia**

Opisywane w pracy zagadnienie dotyczy krótkiej charakterystyki narkotyków, w szczególności dwóch najbardziej rozpowszechnionych – amfetaminy i metamfetaminy oraz analityczne metody wykrywania tych narkotyków w próbkach biologicznych.

### 3. Przegląd literatury

Obecnie narkotyki może sklasyfikować na (Jabłoński i in. 2012):

- 1) *Depresanty* – substancje opóźniające działanie ośrodkowego układu nerwowego, powodujące upośledzenie procesów intelektualnych

Przykłady: Heroina, GHB, Alkohol etylowy, Barbiturany

- 2) *Stymulanty* – substancje pobudzające działanie ośrodkowego układu nerwowego, powodujące wyostrenie zmysłów

Przykłady: Amfetamina, Metamfetamina, Kokaina, Ecstasy, Katina, Katinon

- 3) *Halucynogeny* – substancje zaburzające działanie ośrodkowego układu nerwowego, powodujące ubarwiony, zniekształcony obraz świata, oraz jego spowolnione tempo, a także pseudohalucynacje

Przykłady: LSD, PCP, Grzyby halucynogenne, Meskalina, Harmina, Harmalina

- 4) *Opioidy* – substancje pobudzające receptory opioidowe

Przykłady: Morfina, Kodeina, Tebaina, Opium

- 5) *Kannabinoidy* – substancje oddziałujące na receptory kannabinoidowe

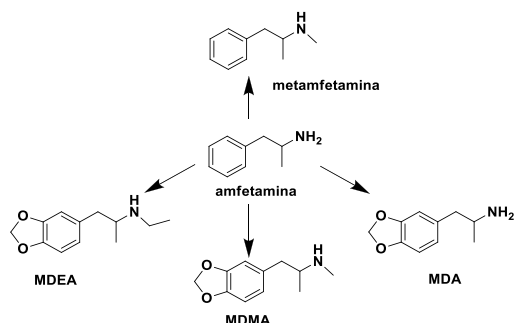
Przykłady: Marihuana, Haszysz, Olej haszyszowy

- 6) *Inhalanty* – wziewne środki odurzające, substancje wywołujące stan oszołomienia

Przykłady: Toluen, Ksylen, Heksan, Benzyna, Propan, Butan

#### Amfetamina i metamfetamina oraz pochodne – charakterystyka

Amfetamina i metamfetamina są substancjami silnie pobudzającymi, które należą do jednych z najczęściej zażywanych narkotyków pochodzenia syntetycznego. (Jędrzejko 2009; Krawczyk 1998).



Rys. 1. Wzory strukturalne opisywanych narkotyków

Amfetamina (Rys.1), powszechnie występuje w postaci soli siarczanu (Krawczyk 2005). Jest mieszaniną racemiczną dwóch stereozomerów: D-amfetaminy i L-amfetaminy, które różnią się działaniem fizjologicznym. Najczęściej występuje w postaci proszku, który w zależności od technologii produkcji i rodzaju zanieczyszczeń może przyjmować różne kolory, od białego po żółty, różowy, czy brązowy. Amfetamina jest bezzapachowa, jednak czasami ze względu na zanieczyszczenie rozpuszczalnikiem może posiadać nieprzyjemny zapach (Gąsiorowski i Kubica 2012). Można ją przyjmować doustnie, dożylnie i donosowo (Straub 2015). Jest to silny narkotyk pobudzający ośrodkowy układ nerwowy. U osób zażywających amfetaminę, w organizmie wywala się dopamina, norepinefryna oraz serotonina. Substancje te powodują niepoohamowany przypływu energii i euforii, poprawia się koncentracja i podzielność uwagi. Będący pod wpływem są pewni siebie, mający poczucie zwiększonej wytrzymałości, nie odczuwają zmęczenia nawet po długotrwałym wysiłku (Jędrzejko 2009). Amfetamina jest narkotykiem poważnie uzależniającym, może prowadzić do głębokich depresji z próbami samobójczymi. Osoby uzależnione odczuwają silne bóle głowy, skurcze jelit, suchość w ustach, są agresywne i drażliwe. Dodatkowo narkotyk ten

powoduje zwężenie źrenic, wystąpienie rumieńców lub błądź, a u męczyzn opóźnia ejakulację. Przedawkowanie amfetaminy często kończy się atakiem serca, niewydolnością nerek czy też wylewem (Gąsiorowski i Kubica 2012).

Metamfetamina (Rys.1), podobnie jak amfetamina, najczęściej jest proszkiem, który będąc zanieczyszczony występuje w kolorach żółtym, białym (Krawczyk 1998). Oczyszczona metamfetamina spotykana jest jako przezroczyste, błyszczące kryształy (nazywane potocznie *crystal* lub *ice* ze względu na podobieństwo do lodu). Metamfetamina przyjmowana jest doustnie, dożylnie, donosowo lub jest palona (Straub 2015). Ma ona silniejsze działanie pobudzające na ośrodkowy układ nerwowy niż amfetamina. Zażywana przez ciężarne kobiety zwiększa ryzyko wystąpienia choroby Parkinsona i zaburzeń układu nerwowego u dzieci narażonych na jej działanie. Przyczyną tego jest wyniszczenie komórek nerwowych wydzielających dopaminę. Osoby po zażyciu mają mniejszy apetyt, wykazują dużą aktywność fizyczną i wysoki stan pobudzenia. Częstsze przyjmowanie tego narkotyku powoduje coraz to groźniejsze skutki. Osoby są nerwowe, wykazują zaburzenia nastroju, często towarzyszą im halucynacje, które kończą się próbami samobójczymi. Charakterystycznymi cechami fizycznymi są wysypka oraz szerniałe, gnijące, kruche zęby, wywołane mimowolnym zaciskiem szczęki. Nagłe odstawienie metamfetaminy, może spowodować u człowieka głęboki sen trwający nawet do 48godzin, z którego po przebudzeniu istnieje ryzyko depresji. Dodatkowo może powodować duszności, skurcze jelit i bóle głowy. Przedawkowanie metamfetaminy powoduje wysoką temperaturę ciała, krwotoki, ostrą niewydolność organizmu, a także problemy z krążeniem mogące prowadzić do zgonu (Straub 2015).

Amfetamina była znana już za czasów II wojny światowej, stosowana przez pilotów i żołnierzy, w celu pozbycia się oznak zmęczenia i zwiększenia poziomu koncentracji. W medycynie wykorzystywano ją jako środek leczący astmę oskrzelową, stany zapalne błony śluzowej nosa, napadawę senność, a także była podawana osobom, u których zdiagnozowano zespół ADHD (Gąsiorowski i Kubica 2012). Metamfetamina dopiero później zyskała popularność. Oba narkotyki chętnie były stosowane przez osoby otyłe, jako środki odchudzające, ponieważ ograniczały łaknienie oraz przez sportowców, jako środki dopingujące. Obecnie amfetamina i metamfetamina są zażywane przez narkomanów, pełniąc rolę środków odurzających.

Entaktogenami nazywamy zmodyfikowane struktury amfetaminy i metamfetaminy. Najbardziej znanymi są: MDA (3,4-metylenodioksyamfetamina), MDMA (3,4-metylenodioksymetaamfetamina) oraz MDEA (3,4-metylenodioksyetyloamfetamina) (Rys.1) (Krawczyk 1998; Krawczyk 2005). Największą popularnością cieszy się MDMA, który jest wypełniaczem tabletek nazywanych Ecstasy, uznawanych za narkotyk towarzyski (Gąsiorowski i Kubica 2012). Ułatwia on nawiązywanie kontaktów z ludźmi, wprowadza człowieka w stan rozluźnienia, oraz sprawia że czuje się pewny siebie. Po długotrwałym zażywaniu, do skutków należą m.in. mdłości, szernkości, zawroty głowy, zaburzenia koordynacji, skoki temperatury (nawet do 42°C), upośledzenie pamięci (Jędrzejko 2009).

### **Próbki biologiczne – charakterystyka ogólna**

Obecność narkotyków można oznaczać z wielu próbek biologicznych. Każda próbka ma swoje cechy charakterystyczne, które decydują o obecności oraz ilości substancji odurzających, psychotropowych w ciele podejrzanego. Na przykład w celu oznaczenia aktualnego stężenia danej substancji, zaleca się użycia osocza bądź śliny jako próbki biologicznej. Moc natomiast dostarcza informacji o stężeniu składników „zageszczonych” po ostatnim opróżnieniu pęcherza. (Wachowiak 2009).

*Krew* – w połączeniu z limfą, płynem międzykomórkowym oraz płynem mózgowo-rdzeniowym tworzy środowisko wewnętrzne ustroju. Sprawdzany jest poziom ksenobiotyków we krwi. Ich obecność świadczy o wcześniejszym zażyciu przez osobę substancji odurzających, psychotropowych bądź trucizny, ponieważ organizm ludzki nie produkuje ksenobiotyków ani też w normalnych warunkach nie są one przyjmowane z pożywieniem. Substancje oznaczane to m.in. morfina, amfetamina i jej analogi, kokaina, barbiturany (Wachowiak 2009).

*Ślina* - jest to wydzielina głównie produkowana przez trzy duże parzyste gruczoły ślinowe: przyusznicze, podżuchwowe i podjęzykowe. Czas, w którym narkotyki utrzymują się w ślinie na

poziomie wykrywalnym zależy od wielu czynników (wielkość dawki, droga przyjmowania narkotyku, rodzaj narkotyku, waga i stanu zdrowia osoby przyjmującej, dieta). Ślina używana jest do określenia aktualnego stężenia narkotyku lub jego metabolitów niezwiązanych z białkami. Substancje oznaczane to m.in. amfetamina, metamfetamina, kokaina, marihuana, opiaty (Szukalski i Mirkiewicz 1995; Szukalski i in. 1997; Szukalski 2001).

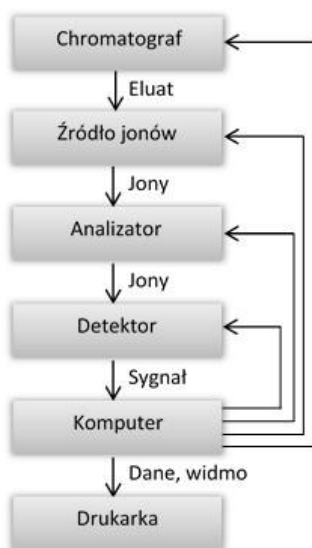
*Włos* – jest zrogowaciałym tworem naskórka, który zbudowany jest z łodygi oraz korzenia. Głównym materiałem budulcowym włosa jest keratyna, natomiast za barwę odpowiada melanina. Włos składa się z lipidów, wody, białek oraz popiołu. Badania włosów umożliwiają poznanie historii pacjenta, pozwalają potwierdzić zażycie substancji, jednakże nie wykryją one narkotyków przyjmowanych bezpośrednio przed analizą, ponieważ czas wbudowania się substancji w strukturę włosa jest bardzo długi (około tydzień). Narkotyki w trzonie włosa pozostają dosyć długo, dlatego czas, w którym można je wykryć jest wydłużony. Włos jest mechanicznie odporny i chemicznie obojętny, tak więc nie wymaga specjalnych warunków w przechowywaniu. Substancje oznaczane to m.in. amfetamina, metamfetamina, opiaty, heroina (Polkowska i in. 2003).

*Mocz* – jest produktem ubocznym funkcjonowania nerek, oprócz wody zawiera prawie wszystkie końcowe produkty przemiany materii. Stanowi podstawowy materiał do kontrolowania abstynencji narkotykowej oraz diagnostyki stanów ostrych. Obecność ksenobiotyku w moczu oraz równoczesny jego brak we krwi potwierdza wcześniejsze zażywanie. Testy moczu są bardzo rozpowszechnione ze względu na swoją skuteczność i niską cenę. Pozwalają określić rodzaj oraz stężenie przyjętych wcześniej substancji, które zależy od ilości wypitych płynów. Dla każdego narkotyku czas detekcji jest inny. Substancje oznaczane to m.in. morfina, kokaina, heroina, marihuana, amfetamina i metamfetamina (Szukalski i Mirkiewicz 1995).

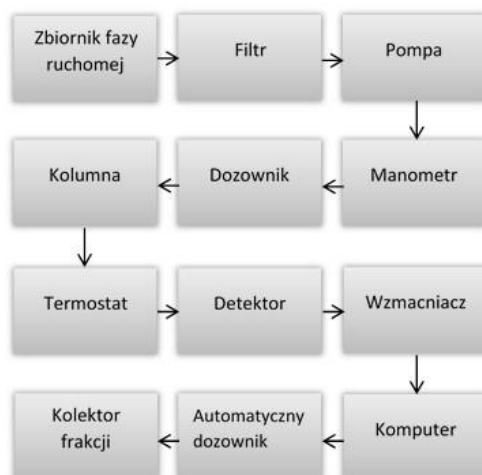
### **Metody oznaczania oraz rozdzielania amfetamin**

Metamfetamina i amfetamina najczęściej oznaczane są metodą chromatografii gazowej (GC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), jednak aby poprawnie przebiegła ich analiza, należy odpowiednio przygotować próbki. Technika SPME (*Solid Phase Microextraction*) doskonale sprawdza się w ich preparatyce, ponieważ jest techniką ekstrakcyjną, którą stosuje się w oznaczaniu związków o różnej lotności, można ją wykorzystywać do próbek ciekłych, stałych oraz gazowych, a także umożliwia prawie całkowite wyeliminowanie rozpuszczalników z tego procesu. Metoda ta jest szybka, łatwa, czuła oraz uniwersalna. Istotną rolę odgrywają włókna, które pokrywa faza stacjonarna. Włókna te są umieszczone w specjalnej strzykawce, której konstrukcja umożliwia wysuwanie i wsuwanie włókna do wnętrza igły. Poprzez kapsel igła z włóknem wprowadzana jest do zamkniętego naczynka z analizowaną substancją, która następnie jest wyciągana i umieszczana w cieczy, bądź w parach nad cieczą (Krawczyk 1999). Mikroekstrakcja na fazie stałej polega na modyfikacji sorbentu. Najpierw nanoszony jest on na włókno, następnie dochodzi do podziału związków organicznych pomiędzy fazę stacjonarną osadzoną na włóknie a matrycę. Odbywa się on do momentu ustalenia stanu równowagi termodynamicznej między fazami. W kolejnym etapie następuje desorpcja termiczna zaadsorbowanych wcześniej substancji w komorze dozownika gazowego, która powoduje znaczną zmianę współczynnika podziału. Uwolnione cząsteczki analitów są przechwytywane przez gaz nośny i następnie przenoszone do kolumny chromatograficznej, w której następuje ich rozdzielanie i oznaczenie metodą chromatografii gazowej (Palacz 2012). Technika SPME ściśle łączy się z chromatografią gazową, jednakże korzystając ze specjalnej przystawki można wprowadzić próbkę do chromatografu cieczowego (Krawczyk 1999).

Chromatografia gazowa głównie w kryminalistyce sprzężona jest z spektrometrią mas (*GC/MS - Gas Chromatography - Mass Spectrometry*), ze względu na dokładniejsze pomiary (Rys.2). GC/MS cechuje duża czułość oraz nieporównywalnie niska granica wykrywalności. Metoda ta głównie stosowana jest do identyfikacji środków odurzających oraz psychotropowych. Podstawą spektrometrii mas dla związków organicznych jest tworzenie się jonów badanej substancji pod wpływem bombardowania jej elektronami. Następnie dochodzi do fragmentacji jonów molekularnych (jonów kationodniowych o nieparzystej liczbie elektronów). Jony te są rozdzielane na podstawie ich stosunku masy do ładunku i kolejno trafiają do detektora, który przekazuje sygnały do komputera i w wyniku tego otrzymujemy widmo masowe (Krawczyk 1999).



Rys. 2. Schemat działania GC/MS



Rys. 3. Schemat działania HPLC

Poza chromatografią gazową, specjaliści w laboratoriach kryminalistycznych w celu ustalenia obecności i ilości substancji odurzających oraz psychotropowych, korzystają z wysokosprawnej chromatografii cieczowej (*HPLC- High- performance Liquid Chromatography*) (Rys.3). Metodę tę cechuje wysoka selektywność. Wykorzystywane są konkurencyjne oddziaływania pomiędzy cząsteczkami rozdzielanych substancji i cząstkami eluentu, a powierzchnią sorpcyjną fazy stacjonarnej. W chromatografii cieczowej eluentem jest ciecz (zazwyczaj rozpuszczalnik organiczny bądź mieszanina rozpuszczalników). HPLC należy do chromatografii kolumnowej, co oznacza, że analizowana próbka jest rozpuszczana w odpowiednio dobranym rozpuszczalniku (w zależności od właściwości substancji i zastosowanego układu) i następnie analizowana. ( He et Kang 2006).

Wysokosprawna chromatografia cieczowa łączy się z techniką DLLME (*Dispersive Liquid – Liquid Microextraction*). Metoda ta charakteryzuje się prostotą, szybkością, niską ceną, możliwością automatyzacji oraz dużymi wartościami liczbowymi współczynnika wzbogacenia. DLLME jest młodą techniką ekstrakcyjną, złożoną z 2 etapów. Pierwszym jest wprowadzenie, odpowiednio przygotowanej mieszaniny rozpuszczalnika dyspergującego i ekstrahującego do

roztworu wodnego zawierającego badane anality. Rozpuszczalnik ekstrahujący ulega dyspersji do drobnych kropelek, stanowiących miejsce wzbogacenia analitów. Drugi etap polega na oddzieleniu analitów od roztworu, poprzez odwirowanie. Ekstrakt zawierający anality jest następnie odpowiednio analizowany w chromatografii (Stepnowski i in. 2010). Dodatkowymi metodami, które dobrze przygotowują próbkę do analizy przy pomocy HPLC są: HF- LPME( mikroekstrakcja przez membranę do fazy ciekłej) oraz SDME (mikroekstrakcja do kropli). Obie te metody charakteryzuje prostota, efektywność, szybkość i selektywność rozdzielania. HF- LPME to ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz, w której ciecz ekstrahująca znajduje się w przestrzeniach porowatego włókna, gdzie zostaje unieruchomiona. Włókno to może być zamocowane na końcach igieł dwóch mikrostrzykawek lub na końcu igły jednej mikrostrzykawki i zanurzonego w roztworze próbki. Po zakończonym rozdziale, ekstrakt z włókna jest zasysany do strzykawki. Metoda ta pozwala dobrać odpowiednią ciecz ekstrahującą oraz rodzaj porowatego włókna. SDME jest metodą, która zmniejsza zużycie rozpuszczalników, jednakże aby móc ją przeprowadzić rozpuszczalność analitu w rozpuszczalniku ekstrahującym musi być większa niż w próbce. Można ją stosować do próbek ciekłych oraz gazowych. SDME następuje przez rozpuszczanie się składników próbki w kropli cieczy, która jest zawieszona na końcu igły strzykawki. W zależności od tego czy kropla rozpuszczalnika jest bezpośrednio zanurzona w próbce czy też nie następują różne drogi rozdzielania. Jeśli kropla rozpuszczalnika jest zanurzona, to ekstrakcja następuje przez podział analitu między dwie ciekłe fazy, natomiast jeżeli nie jest zanurzona, to lotne anality z próbki ciekłej, które znajdują się w fazie gazowej rozpuszczają się w kropli rozpuszczalnika umieszczonej nad powierzchnią próbki. Następnie kropla rozpuszczalnika ekstrahującego jest wsysana do strzykawki i przenoszona do dozownika chromatografu (Stepnowski i in. 2010, Lin et al. 2017).

#### **4. Podsumowanie**

Amfetamina i metamfetamina, oraz ich pochodne występujące w próbkach biologicznych (np. krew, mocz, włos) najczęściej są analizowane metodami chromatograficznymi, tj: chromatografią gazową z detektorem masowym oraz wysokociśnieniową chromatografią cieczową. Obie metody chromatograficzne cechuje dokładność, wysoka czułość, selektywność oraz szeroki zakres zastosowań. Możliwa jest analiza poszczególnych składników, jednak najpierw należy je odpowiednio przygotować. W zależności od ich właściwości możemy zastosować: SPME (mikroekstrakcja do fazy stałej), DLLME (dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz), SDME (mikroekstrakcja do pojedynczej kropli). Każda z wymienionych technik mikroekstrakcyjnych ma swoje wady i zalety, dlatego ważne jest poszukiwanie skuteczniejszych i wydajniejszych metod wykrywania narkotyków w próbkach biologicznych.

#### **5. Literatura:**

- Gąsiorowski J, Kubica M (2012) Narkotyki. Narkotyki, Charakterystyka wybranych substancji. Katowice: Wydawnictwo: Szkoła Policji w Katowicach, s. 14-16, 20-23.
- Goulão J, Götz W (2015) Europejski Raport narkotykowy. Tendencje i zagrożenia. Luksemburg: Urząd Publikacji Unii Europejskiej.
- He Y, Kang YJ (2006) Single drop liquid-liquid-liquid microextraction of methamphetamine and amphetamine in urine, *Journal of Chromatography A*, 1133(1-2), 35-40.
- Jabłoński P, Bukowska B, Czabała JC (2012) Uzależnienie od narkotyków. Podręcznik dla terapeutów. Łódź: Krajowe Biuro ds. Przeciwdziałania Narkomanii, s. 35-87.
- Jędrzejko M (2009) Narkomania - Spojrzenie wielowymiarowe, Warszawa-Pułtusk: Mariusz Jędrzejko & Oficyna Wydawnicza ASPRA-JR, s. 198- 205, 239- 241, 245.
- Krawczyk WS (1998) Profilowanie narkotyków, Warszawa: Wydawnictwo CLK KGP.
- Krawczyk WS (1999) Chromatografia gazowa w kryminalistyce, Warszawa: Wydawnictwo CLK KGP.
- Krawczyk WS (2005) Nielegalne laboratoria narkotykowe, Warszawa: Wydawnictwo CLK KGP.
- Krawczyk WS (2015) Amfetamina i jej pochodne – metody nielegalnej produkcji, Warszawa: Wydawnictwo CLK KGP.

- Lin Z, Li J, Zhang X et al. (2017) Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of seven recreational drugs in human whole blood using gas chromatography–mass spectrometry, *Journal of Chromatography B* 1046, 177-184.
- Palacz M (2012) Właściwości i zastosowanie modyfikowanej krzemionki osadzonej na włóknie kwarcowym w technice SPME, *Praca Doktorska*, Poznań, s. 18-22.
- Polkowska Ż, Kozłowska K, Namieśnik J (2003) Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym. Płyny biologiczne jako źródło informacji o narażeniu człowieka na środowiskowe czynniki chemiczne. Gdańsk: CCEAM.
- Stepnowski P, Synak E, Szafrank B i in. (2010) *Techniki separacyjne*. Gdańsk: Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego.
- Straub U (2015) Zaburzenia psychiczne i zaburzenia zachowania spowodowane przyjmowaniem substancji psychoaktywnych. Zespół Placówek Resocjalizacyjno socjoterapeutycznych w Oławie. Oława: MOS Oława, s. 1-13.
- Szukalski B, Mirkiewicz E (1995) Oznaczenie narkotyków w materiale biologicznym – ślinie i włosach. *Alkoholizm i Narkomania*, 18, 6-26.
- Szukalski B, Mirkiewicz E, Taracha E (1997) Badania amfetaminy i jej psychoaktywnych analogów w moczu narkomanów metodą FPIA i HPTLC, *Alkoholizm i Narkomania*, 26, 33- 36.
- Szukalski B (2001) Analiza środków psychoaktywnych w materiale biologicznym. *Alkoholizm i Narkomania*, 14, 151-163.
- Wachowiak R (2009) Aktualne możliwości diagnostyczno-interpretacyjne w opiniowaniu sądowo-lekarskim wpływu wybranych związków psychoaktywnych na zdolność psychomotoryczną człowieka. Zielona Góra: Prokuratura Okręgowa w Zielonej Górze, s 1-10.

## **10. Zastosowanie cieczy jonowych w przygotowywaniu próbek biologicznych zawierających metamfetaminę i amfetaminę**

The application of ionic liquids in preparing biological samples with methamphetamine and amphetamine

Rutecka Sandra<sup>(1)</sup>, Kukawka Rafał<sup>(1,2)</sup>, Śmiglak Marcin<sup>(1,2)</sup>

<sup>(1)</sup>Pracownia Chemii i Technologii Polimerów Nieorganicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

<sup>(2)</sup>Poznański Park Naukowo Technologiczny, Fundacja Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Opiekun naukowy: dr hab. inż. Marcin Śmiglak

Rutecka Sandra: san-rut@wp.pl

Słowa Kluczowe: ciecze jonowe, mikroekstrakcja, narkotyki, chromatografia

### **Streszczenie**

W kryminalistyce istotną rolę odgrywa przygotowanie próbki z materiału biologicznego (krew, mocz, ślina, włosy) oraz jej analiza przy zastosowaniu technik instrumentalnych (najczęściej GC/MS i HPLC). Konieczny jest więc rozwój metod analitycznych, które umożliwią precyzyjniejsze oznaczenie zawartości narkotyków w próbkach biologicznych pobranych od podejrzanych o ich zażycie. Ze względu na złożoność matryc biologicznych oraz niskie stężenia oznaczanych substancji stosuje się mikroekstrakcyjne metody przygotowania próbki. W oparciu o dostępną literaturę przedstawiono wybrane techniki analityczne z zastosowaniem cieczy jonowych, które stanowią alternatywę dla dotychczas stosowanych związków. Poprawiają one tym samym jakość, precyzję oraz czułość analizy.

### **1. Wstęp**

Narkotyki nazywane są substancjami odurzającymi, które oddziałują na ośrodkowy układ nerwowy, przez co mogą powodować uzależnienie fizyczne jak i psychiczne. Mogą być pozyskiwane z roślin oraz wytwarzane na drodze syntezy chemicznej. Amfetamina i metamfetamina należą do narkotyków syntetycznych. Wpływają na ludzki stan świadomości, między innymi na odbiór i ocenę bodźców zewnętrznych. W Europie stanowią jedną z głównych sposobów uzależnień zarówno wśród młodzieży jak i dorosłych. (Jędrzejko 2009; Krawczyk 1998).

### **2. Opis zagadnienia**

Opisywane w pracy zagadnienie dotyczy krótkiej charakterystyki technik mikroekstrakcyjnych używanych w laboratoriach kryminalistycznych oraz ich modyfikacji z zastosowaniem cieczy jonowych, jako innowacyjnej metody przygotowania próbek zawierających amfetaminę i metamfetaminę w materiale biologicznym – moczu.

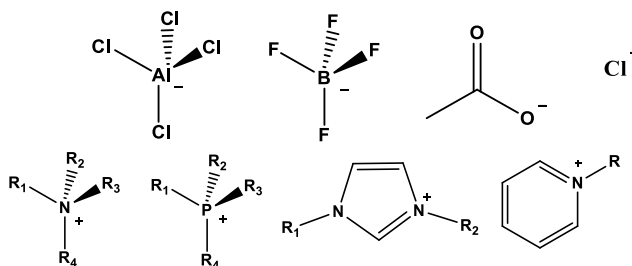
### **3. Przegląd literatury**

Ciecze jonowe (IL, *ang. Ionic liquids*) są to organiczne sole, zbudowane z organicznego kationu oraz organicznego lub nieorganicznego anionu, o temperaturach topnienia poniżej 100°C (Welton 1998). Ze względu na możliwość doboru oraz zmiany w strukturze kationu/anionu oszacowano możliwość otrzymania 10<sup>18</sup> kombinacji jonów. Ciecze jonowe, które topią się w temperaturach poniżej 20°C i nazywane są „niskotemperaturowymi cieczami jonowymi” (*ang. Room-Temperature Ionic Liquids*). (Welton 1998). Stan ciekły w temperaturze pokojowej zawdzięczają stosunkowo niskiej energii sieciowej (Kubisa 2006). Pierwsze informacje na temat badania właściwości cieczy jonowych zaczęły się pojawiać w literaturze pod koniec XX wieku. Zapoczątkowało to duże zainteresowanie tymi związkami chemicznymi, ze względu na ich naturę,



która znacznie różni się od typowych, dotychczas stosowanych rozpuszczalników organicznych (Pernak 2003).

Struktury przykładowych kationów i anionów przedstawiono na Rysunku 1 (Welton 1998).



**Rys. 1.** Struktury kationów i anionów, z których zbudowane są cieczje jonowe

Budowa kationu oraz rodzaj anionu decydują o ich właściwościach fizykochemicznych (m.in. temperaturze topnienia, lepkości, gęstości, hydrofobowości, hydrofilowości) oraz właściwościach aplikacyjnych. Ważnymi cechami cieczy jonowych są: wysoka stabilność termiczna, niska prężność par, niepalność, zdolność przewodzenia prądu oraz mieszania się z różnymi rozpuszczalnikami. Wynika to z oddziaływań międzycząsteczkowych oraz elektrostatycznych pomiędzy ugrupowaniami kationu i anionu zawartych w cieczy jonowej.

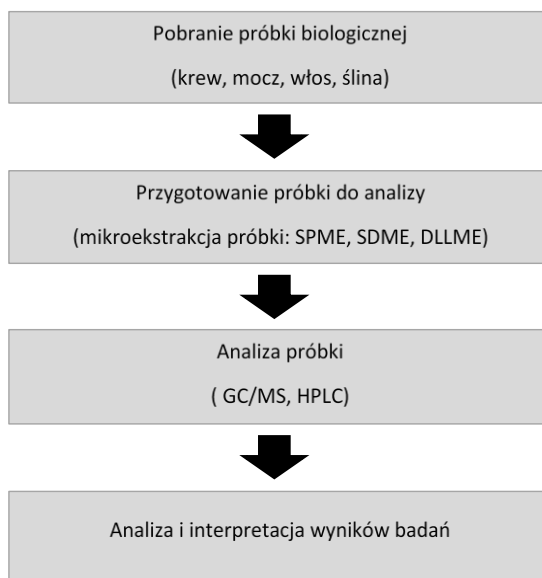
Właściwości cieczy jonowych można kontrolować poprzez nadanie odpowiednich grup funkcyjnych bądź zmiany kombinacji kation/anion w cieczy jonowej, a także poprzez ich mieszanie z tradycyjnymi rozpuszczalnikami. Ta cecha pozwala nazywać cieczje jonowe rozpuszczalnikami projektowanymi (*ang. tuneable*), które dzięki temu mogą być dostosowywane do procesów, w których mają być wykorzystywane.

Cieczje jonowe cieszą się dużym zainteresowaniem w wielu dziedzinach ze względu na szereg unikalnych właściwości. Wykorzystywane są m.in. jako rozpuszczalniki w syntezie i katalizie organicznej, w reakcjach biokatalitycznych oraz biotechnologii (Marczewska-Boczkowska 2003). Stosowane są również jako chemiczne źródła prądu i kondensatory elektrochemiczne, a także jako wymienniki ciepła w kolektorach energii słonecznej. Cieczje jonowe cechuje wysoka aktywność wobec bakterii i grzybów, dlatego też są dobrymi środkami bakteriobójczymi oraz grzybobójczymi. (Pernak 2003). Oprócz wyżej wymienionych zastosowań cieczje jonowe stanowią cenny materiał się w chemii analitycznej, do przygotowania i ekstrakcji próbek, chromatografii, elektroforezy kapilarnej, spektrometrii mas i wykrywaniu elektrochemicznym.

W kryminalistyce, dąży się do opracowania metod analitycznych, które pozwalają przeprowadzić analizę związków z wybranego materiału biologicznego, w szczególności ważne jest przygotowanie próbki z jak najmniejszą ilością zanieczyszczeń, mogących zakłócić wyniki przeprowadzonych badań i wpłynąć na ich błędną interpretację. Najczęściej używane w tego typu laboratoriach są metody wykorzystujące chromatografię gazową lub wysokosprawną chromatografię cieczową. Szczególnie istotną rolę techniki przygotowania próbek odgrywają przy identyfikacji i oznaczaniu ilościowym narkotyków w próbkach biologicznych (Krawczyk 2015, Palacz 2012).

W niniejszej pracy przedstawiono przegląd literatury dotyczący metod analitycznych wykrywania amfetaminy i metamfetaminy w próbce moczu z wykorzystaniem cieczy jonowych jako poprawiających efektywność metody. Amfetamina i metamfetamina są syntetycznymi narkotykami, które silnie oddziałują na ośrodkowy układ nerwowy. Ze względu na zbliżoną budowę chemiczną charakteryzują się podobnymi właściwościami fizykochemicznymi. Oba narkotyki mogą być przyjmowane doustnie, donosowo lub dożylnie. (Straub 2015) Osoby zażywające takie substancje wykazują m.in. dużą aktywność fizyczną i wysoki stan pobudzenia. Czas, w którym możemy pobrać próbkę moczu i zbadać czy podejrzany zażył amfetaminę, metamfetaminę bądź ich entaktogeny

wynosi 2-4dni. Na czas utrzymywania się narkotyków w wydalinie działa wiele czynników tj. dieta, ilość spożytych płynów, wiek, waga, płeć, aktywność fizyczna. (Jędrzejko 2009; Krawczyk 1998).

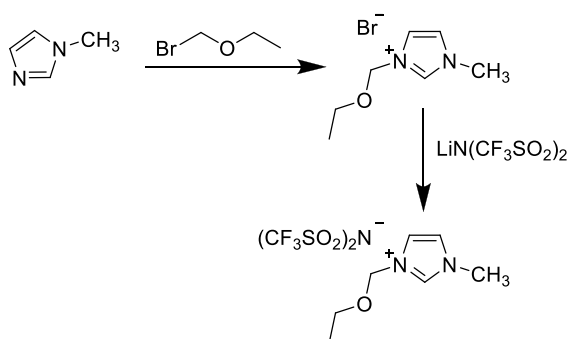


**Rys. 2.** Schemat obrazujący etapy w wykrywaniu narkotyków w materiale biologicznym

Proces wykrywania narkotyków w materiale biologicznym (Rys 2.) składa się z następujących etapów: (i) pobranie materiału biologicznego, (najczęściej są to próbki krwi, moczu, włosów oraz śliny) (ii) przygotowanie próbki, najczęściej metodami ekstrakcyjnymi oraz (iii) wprowadzenie przygotowanej próbki do chromatografu HPLC lub GC/MS, (iv) analiza i interpretacja wyników. Jakość wykonania oznaczeń zależy głównie od procesów (ii) i (iii) dlatego cały czas szuka się nowych rozwiązań mogących ulepszyć wykorzystywane obecnie metody. Najczęściej stosowanymi technikami przygotowania próbek biologicznych są: mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME), dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz (DLLME) oraz mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (SDME). Ich wybór zależy od rodzaju próbki, którą otrzymuje się do analizy, ponieważ każdy materiał biologiczny ma odmienne właściwości od pozostałych. Przygotowanie próbki metodą mikroekstrakcja do fazy stałej najczęściej stosuje się gdy w dalszej analizie używa się chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS), natomiast pozostałe dwie (SDME, DLLME) łączą się z wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC). Obie metody chromatograficzne są efektywne. GC/MS jest analityczną techniką chromatograficzną, w której fazą nośną jest gaz (najczęściej hel). Chromatografia gazowa umożliwia procentowe ustalenie składu mieszanin związków chemicznych, a z zastosowaniem spektrometrii mas pozwala zidentyfikować strukturę chemiczną związków. W przypadku wysokosprawnej chromatografii cieczowej fazą nośną jest ciecz (rozpuszczalnik organiczny). Metoda ta również pozwala ustalić skład mieszaniny jak i strukturę związków, które zawiera.

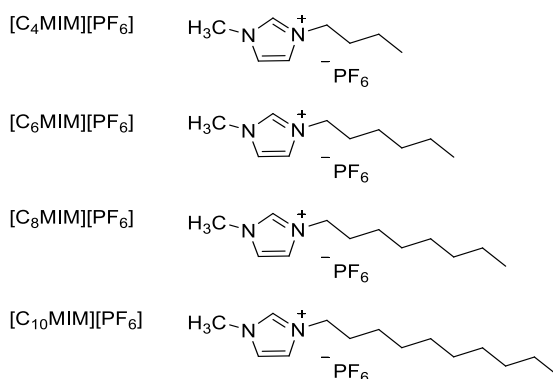
Ciecze jonowe stosowane w mikroekstrakcji do pojedynczej kropli SDME (*ang.* *Single Drop Microextraction*) umożliwiają wytworzenie dużych i stabilnych mikrokropli, które nie są podatne na parowanie podczas ekstrakcji, ze względu na ich wysoką lepkość oraz niską prężność par (Han et al. 2010). Mogą one zapewnić efektywniejszą ekstrakcję analitów z próbki oraz większą precyzję w porównaniu z zastosowaniem tradycyjnych, szybko odparowujących rozpuszczalników organicznych. Dodatkowa możliwość modyfikowania ILs prowadzi do zwiększenia czułości metody oraz niższej granicy wykrywalności. Technika SDME z wykorzystaniem cieczy jonowych znalazła już zastosowanie w laboratoriach analitycznych, w szczególności w analizie patogenów chorobotwórczych w próbkach biologicznych (Anderson et al. 2006; Soukup-Hein et al. 2009). Pomimo wielu zalet i potencjalnych możliwości zastosowania ILs wciąż nie są one wykorzystywane w przypadku mikroekstrakcji narkotyków z próbek biologicznych w kryminalistyce, i jak do tej pory

nie opublikowano żadnych prac naukowych opisujących możliwości użycia tych związków w omawianej problematyce. (Ho et al. 2014, Liu et. al. 2005 )



**Rys. 3.** Schemat syntezy [EeMim][NTf<sub>2</sub>] – cieczy jonowej wykorzystywanej do mikroekstrakcji.

W mikroekstrakcji do fazy stałej SPME (*ang. Solid Phase Microextraction*) ciecz jonowa stanowi fazę stacjonarną, będąca powłoką włókna krzemionkowego. Otrzymywana jest poprzez nasycenie i usieciowanie elastomeru silikonowego na powierzchni stopionego włókna krzemionkowego. Zastosowanie cieczy jonowej zamiast dotychczas wykorzystywanych polimerów (tj. PDMS – polidimetylosiloksan, PA – poliakrylan, PDMS-DVB – polidimetylosiloksan-polidiwinylobenzen) pozwala zwiększyć selektywność, wydajność oraz czułość a także zapewnia powtarzalność dalszej przeprowadzonej analizy. (Palacz 2012) Metodę tę opisali Y. He i inni (He i in. 2009). W swoim artykule wykorzystali cieczą jonową - bis(trifluorometylosulfonylo)imidek 1-etoksyetylo-3-metylimidazoliowy ([EeMim][NTf<sub>2</sub>]) otrzymany z bromku 1-etoksyetylo-3-metylimidazoliowego ([EeMim]Br (Rys. 3). Następnie ciecz jonowa została usieciowana na powierzchni stopionego włókna krzemionkowego. Powłoka ta wykazywała stabilność w temperaturze pokojowej jak i podwyższonej (220°C). Dodatkową korzyścią była możliwość wielokrotnego użycia jednego włókna (nawet do 100 razy), ponieważ jego wielokrotne użycie nie



**Rys. 4.** Struktury cieczy jonowych używanych do mikroekstrakcji DLLME.

wpływało na wydajność mikroekstrakcji. Dzięki temu metoda stała się dokładniejsza, bardziej wszechstronna i elastyczna niż mikroekstrakcja bez użycia IL. Przy odpowiednim zoptymalizowaniu parametrów procesu (tj. stężenia soli, zasady, temperatury oraz czasu ekstrakcji), oznaczanie

narkotyków w moczu okazało się efektywniejsze, dzięki podwyższeniu czułości, zwiększeniu powtarzalności i precyzji pomiaru.

Technika DLLME, czyli dyspersyjna mikroekstrakcja do fazy ciekłej wykorzystuje ciecz jonową jako ekstrahent, którego zadaniem jest wyodrębnienie danego analitu z roztworu próbki (Wang 2016). Rozpuszczalnik ekstrahujący ulega dyspersji do drobnych kropelek, w których następuje wzbogacenie analitów, a następnie ich pobranie do analizy. Ciecz jonowa, zapewnia liniowość, powtarzalność, wysoki współczynnik wzbogacenia (współczynnik określający zawartość analitu z pobranej próbki w kropli). Ta metoda została opisana przez Wang (Wang i in. 2016). Rozpuszczalnik stosowany w DLLME powinien posiadać charakterystyczne właściwości tj.: słabą rozpuszczalność w wodzie, wysoką czułość i selektywność, większą gęstość niż woda, niską lotność oraz możliwość użycia w chromatografii. Chlorowane rozpuszczalniki spełniają te cechy jednak ich wysoka toksyczność powoduje, że poszukiwane są ich zamienniki. Wybrano zatem alternatywę w postaci cieczy jonowych, jako zielonych rozpuszczalników. Wykorzystano 4 cieczy jonowe (Rys. 4), oparte o kation imidazoliowy z łańcuchami węglowymi o różnej długości do DLLME: [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], [C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], [C<sub>8</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], [C<sub>10</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], w celu sprawdzenia wpływu długości łańcucha na jakość mikroekstrakcji. Pierwsza z nich, [C<sub>4</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], posiadał zbyt niski współczynnik wzbogacenia, aby móc ją użyć w toku dalszej analizy. Największy współczynnik wzbogacenia uzyskano stosując [C<sub>8</sub>MIM][PF<sub>6</sub>]. Powodem jest jej niższa rozpuszczalność w wodzie w porównaniu z [C<sub>6</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], a także niższa lepkość niż w przypadku [C<sub>10</sub>MIM][PF<sub>6</sub>], która sprzyja transferowi metamfetaminy z matrycy próbki do fazy ekstrahującej. Parametry wpływające na jakość mikroekstrakcji (tzn. objętość cieczy jonowej, struktura cieczy jonowej, rodzaj rozpuszczalnika dyspersyjnego, objętość ośrodka dyspersyjnego, wartość pH, temperatura i czas ekstrakcji) zostały ściśle zoptymalizowane. Metoda DLLME z wykorzystaniem cieczy jonowej, sprzężona z HPLC do oznaczania metamfetaminy w ludzkim moczu pozwoliła na wyeliminowanie toksycznych rozpuszczalników organicznych, zapewniła liniowość i powtarzalność. Opracowana metoda pozwoliła na skrócenie czasu trwania analizy (z 10 minut do kilku sekund).

#### **4. Podsumowanie**

Cieczy jonowe ze względu na swoje unikalne właściwości fizykochemiczne z powodzeniem wykorzystuje się w wielu dziedzinach chemii analitycznej, tj. ekstrakcje. W wyżej omówionych mikroekstrakcjach wykazano, że ILs są wysoce skutecznymi fazami ekstrakcji, które zapewniają doskonałą selektywność analitów i zwiększają wydajność przeprowadzonego procesu. Dodatkowo cieczy jonowe, jako projektowalne rozpuszczalniki mogą stanowić alternatywę dla tradycyjnych rozpuszczalników, które często są wysoce toksyczne a także lotne. Możliwość modyfikowania ich struktury, poprzez dobór odpowiedniego kationu i anionu dodatkowo pozwala manipulować ich cechami fizykochemicznymi (tj. lepkość, gęstość, rozpuszczalność), które dostosowywane są do przeprowadzanej analizy. [28] Wszechstronność cieczy jonowych uczyniła z nich nową klasę stacjonarnych faz a także wypełnień kolumn. Mikroekstrakcje DLLME oraz SPME wykorzystując cieczy jonowe, zapewniły uzyskanie odpowiednio rozdzielonych próbek substancji, cechujących się czystością, czułością, co umożliwiło przeprowadzenie dalszej ich analizy objętościowej metodami instrumentalnymi tj. GC/MS oraz HPLC. [29-31]

#### **5. Literatura:**

- Jędrzejko M (2009) Narkomania - Spojrzenie wielowymiarowe, Warszawa-Pułtusk: Mariusz Jędrzejko & Oficyna Wydawnicza ASPRA-JR, s. 198- 205, 239- 241, 245.
- Krawczyk WS (1998) Profilowanie narkotyków, Warszawa: Wydawnictwo CLK KGP.
- Krawczyk WS (2015) Amfetamina i jej pochodne – metody nielegalnej produkcji, Warszawa: Wydawnictwo CLK KGP.
- Kubisa P (2006) Polimery. Perspektywy zastosowań cieczy jonowych w chemii polimerów, Łódź
- Marczewska- Boczkowska K (2010) Właściwości i zastosowanie cieczy jonowych w syntezie nieorganicznych nanomateriałów, Inżynieria materiałowa

- Palacz M (2012) Właściwości i zastosowanie modyfikowanej krzemionki osadzonej na włóknie kwarcowym w technice SPME, Praca Doktorska, Poznań, s. 18-22.
- Pernak J (2003), Ciecze jonowe. Związki na miarę XXI wieku, Przemysł Chemiczny
- Welton T (1999) Room- Temperature Ionic Liquids, Solvents for synthesis and Catalysis, Chemical Reviews 99(8):2071-2084.
- Straub U (2015) Zaburzenia psychiczne i zaburzenia zachowania spowodowane przyjmowaniem substancji psychoaktywnych. Zespół Placówek Resocjalizacyjno socjoterapeutycznych w Oławie. Oława: MOS Oława, s. 1-13.
- He Y, Pohl J, Engel R, et. al. (2009) Preparation of ionic liquid based solid-phase microextraction fiber and its application to forensic determination of methamphetamine and amphetamine in human urine, Journal of Chromatography A 1216: 4824-4830.
- Wang R, Qi X, Zhao L, et. al. (2016) Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the forensic determination of methamphetamine in human urine, Journal of Separation Science 00:1-7.
- Han D, Row KH (2010) Recent Applications of Ionic Liquids in Separation Technology, Molecules 15: 2405-2426.
- Ho TD, Zhang C, Hantao LW et al. (2014) Ionic liquids in Analytical Chemistry: Fundamentals, Advances and Perspectives, Analytical Chemistry 86(1):262-285.
- Anderson JL, Armstrong DW, Wei GT (2006) Ionic Liquids in Analytical Chemistry, Analytical Chemistry 78(9): 2892-2902.
- Soukup-Hein RJ, Warnke MM, Armstrong DW (2009), Ionic Liquids in Analytical Chemistry, Annual Review of Analytical Chemistry 2: 145-168.
- Liu JF, Jing GB, Liu JF et al. (2005) Application of ionic liquids in analytical chemistry, Trends in Analytical Chemistry 24(1): 20-27.

## **11. Zmiany szybkości rozpuszczania i przenikalności przez sztuczne układy błon ibuprofenu jako efekty oddziaływania z poloksamerem**

Changes in dissolution rate and permeability through artificial membranes of ibuprofen as effects of interaction with poloxamer

Magdalena Paczkowska, Judyta Cielecka-Piontek

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

Magdalena Paczkowska: magda.paczowska@gmail.com

Słowa kluczowe: ibuprofen, rozpuszczalność, słabo rozpuszczalne leki, przenikanie

### **Streszczenie**

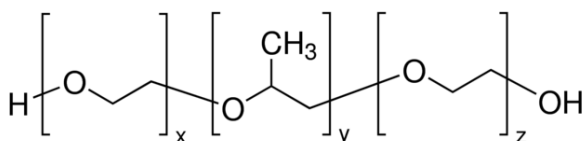
Według systemu klasyfikacji biofarmaceutycznej (BCS, ang. *biopharmaceutical classification system*) ponad połowa nowych substancji czynnych, jak tych aktualnie stosowanych w lecznictwie zaliczana jest do klasy 2, charakteryzujących niską rozpuszczalnością i wysoką przenikalnością, a zatem rozpuszczanie substancji czynnej w środowisku żołądkowo-jelitowym jest etapem determinującym jej przenikanie i absorpcję. Poloksamer 407, trójblokowy kopolimer składający się z centralnego hydrofobowego rdzenia tlenu propylenu otoczonego z dwóch stron hydrofilowymi łańcuchami tlenu etylenu, zaprojektowany został do zwiększania szybkości rozpuszczania słabo rozpuszczalnych substancji czynnych. Dlatego celem niniejszej pracy były badania oddziaływania poloksameru z ibuprofenem. Poloksamer powoduje wzrost szybkości rozpuszczania wraz ze wzrostem przenikalności przez układ sztucznych błon.

### **1. Wstęp**

Większość nowych substancji czynnych, jak również aktualnie stosowanych w lecznictwie charakteryzuje się słabą rozpuszczalnością (Giliyar 2006). Co więcej, coraz większa liczba nowych aktywnych substancji farmaceutycznych (API, ang. *active pharmaceutical ingredient*) wykazuje właściwości silnie lipofilne, co może skutkować niską biodostępnością ze środowiska wodnego, czyli głównie po podaniu doustnym. Uwzględniając właściwości biofarmaceutyczne substancji czynnej, a zwłaszcza jej szybkość rozpuszczania (i rozpuszczalność) oraz zdolność do przenikania barier biologicznych, zaproponowano system klasyfikacji biofarmaceutycznej substancji czynnych – BCS (ang. *Biopharmaceutics Classification System*). Klasyfikacja BCS pozwana na korelację podstawowej cechy fizycznej (rozpuszczalności) z cechą biologiczną (przenikaniem przez błony biologiczne) i w konsekwencji na przewidywanie dostępności biologicznej, oraz dzieli wszystkie substancje czynne na 4 grupy. Do klasy 1 BCS należą te substancje, która charakteryzuje wysoka rozpuszczalność i wysoka przenikalność, klasy 2 – substancje o niskiej rozpuszczalności i wysokiej przenikalności, klasy 3 – substancje o wysokiej rozpuszczalności i niskiej przenikalności, natomiast do klasy 4 – substancje o niskiej rozpuszczalności oraz niskiej przenikalności (Sznitowska 2014). Ponad połowa substancji czynnych zaliczana jest do klasy 2 BCS, a zatem rozpuszczanie substancji czynnej w środowisku żołądkowo-jelitowym jest etapem determinującym jej przenikanie i absorpcję (FDA 2015). Obecnie przemysł farmaceutyczny zajmuje się przede wszystkim zwiększeniem rozpuszczalności/szybkości rozpuszczania słabo rozpuszczalnych w wodzie substancji leczniczych klasy 2 i 4 celem zwiększenia ich biodostępności.

Zwiększanie rozpuszczalności substancji czynnej można osiągnąć poprzez modyfikacje chemiczne (np. otrzymywanie soli lepiej rozpuszczalnych, tworzenie proleków) oraz modyfikacje fizyczne (np. zmniejszanie wielkości cząstek, modyfikacje formy krystalicznej w tym otrzymywanie amorficznych postaci substancji czynnej, rozproszenie substancji czynnej w polimerze oraz tworzenie kompleksów inkluzyjnych). Szczególnie często stosowanym rozwiązaniem jest tworzenie układów z substancjami posiadającymi ugrupowania hydrofilowe, które po połączeniu z substancją czynną mogą zwiększać ich rozpuszczalność.

W ostatnich latach nastąpił wzrost zainteresowania kopolimerami blokowymi, w szczególności pod kątem ich potencjalnego zastosowania jako substancji dostarczających leki. Poloksamerowe kopolimery trójblokowe składają się z centralnego bloku poli(tlenku propylenu) z końcowymi blokami poli(tlenku etylenu) i mają tendencję do tworzenia miceli w roztworze wodnym ze względu na różnicę hydrofobowości pomiędzy blokami poli(tlenku propylenu) i poli(tlenku etylenu) (rys.1). Te micelle zawierają hydrofilową koronę poli(tlenku etylenu) i hydrofobowy rdzeń blokami poli(tlenku propylenu), w którym substancje czynne mogą być solubilizowane i transportowane, co stwarza możliwość bardziej skutecznego kontrolowanego uwalniania w organizmie (Foster 2009).



**Rys. 1.** Wzór strukturalny poloksameru.

Ibuprofen jest niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym (NLPZ), pochodną kwasu propionowego, szeroko stosowanym w leczeniu łagodnego i umiarkowanego bólu i gorączki. Zaliczany jest do 2 klasy BCS charakteryzującej się słabą rozpuszczalnością oraz wysoką przepuszczalnością. Ponieważ stężenia w surowicy i działanie przeciwbólne są skorelowane, szybka absorpcja ibuprofenu może być warunkiem wstępnym szybkiego rozpoczęcia działania. Zatem rozpuszczanie staje się etapem ograniczającym szybkość wchłaniania, a pożądane jest szybkie uwalnianie ibuprofenu w przewodzie żołądkowo-jelitowym po podaniu doustnym.

Celem niniejszej pracy były badania układów poloksameru 407 (nazwa handlowa: Pluronic F-127) z ibuprofenem (IBU) w odniesieniu do możliwości zmian szybkości rozpuszczania oraz przepuszczalności przez modelowe sztuczne układy błon.

## 2. Materiał i Metody

Do badań zastosowano 2 serie ibuprofenu: seria 1 – WA015 (IBU1) oraz seria 2 – IB1V0670 (IBU2), różniące się wielkością cząstek. Binarne układy IBU1 oraz IBU2 z poloksamerem przygotowano w stosunkach wagowych 1:1 oraz 1:5 poprzez ugniatanie w moździerz agatowym.

### *Badania tożsamości*

Eksperymentalne badania tożsamości spreparowanych układów IBU1 oraz IBU2 z poloksamerem zostały prowadzone w oparciu o ocenę zmian w widmach spektralnych (spektroskopia w podczerwieni, ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, FT-IR) samego antybiotyku i po wprowadzeniu jego do układu binarnego.

### *Wysokosprawna chromatografia cieczowa*

Do oceny zmian stężenia ibuprofenu (IBU1 oraz IBU2) podczas badania szybkości rozpuszczania oraz przenikania przez modelowy układ błon zastosowano uprzednio opracowaną metodę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. *high performance liquid chromatography*, HPLC-DAD). Warunki rozdzielania chromatograficznego oznaczania ibuprofenu przedstawiono w Tab.1.

**Tab. 1.** Warunki rozdzielania chromatograficznego opracowanej izokratycznej metody HPLC-DAD.

Parametry rozdzielania chromatograficznego	Oznaczenie ibuprofenu
Faza stacjonarna:	Kinetex-C18 (100 mm x 2,1mm; 5µm)
Faza ruchoma:	A: 0,1% kwas mrówkowy (50%), B: acetonitryl (50%)
Szybkość przepływu fazy ruchomej:	0,5 mL min <sup>-1</sup>
Temperatura kolumny:	30°C
Długość fali detekcji:	264 nm
Objętość naczynia:	5 µL

Metoda zostały zwalidowane zgodnie z wytycznymi ICH i przewodników farmakopealnych w odniesieniu do ich selektywności, precyzji, dokładności oraz wyznaczenia wartości limitów wykrywalności (LOD) i limitów oznaczalności (LOQ) w odniesieniu do możliwości oznaczania zmian stężenia ibuprofenu w układach z poloksamerem podczas badań szybkości rozpuszczania (ICH 2005). Parametry walidacyjne zestawiono w Tab.2.

**Tab. 2.** Parametry walidacyjne

Parametr	Wyniki (IBU1)		Wyniki (IBU2)	
	pH 1,2	pH 6,8	pH 1,2	pH 6,8
<b>Selektywność</b>				
Współczynnik symetrii (wymagany w zakresie 0,8-1,5)	1,15	1,10	1,15	1,15
Brak substancji zakłócających	potwierdzone	potwierdzone	potwierdzone	potwierdzone
Granica wykrywalności (LOD): LOD = 3 SD/a [mg mL <sup>-1</sup> ]	0,0014	0,0062	0,0014	0,0014
Granica oznaczalności (LOQ): LOQ = 10 SD/a [mg mL <sup>-1</sup> ]	0,0043	0,0188	0,0043	0,0042
Liniowość: y = ax + b				
a ± S <sub>a</sub>	7,77 ± 0,31	11,86 ± 9,59	10,58 ± 0,41	14,49 ± 0,17
b ± S <sub>b</sub>	nieznaczące	nieznaczące	nieznaczące	nieznaczące
Współczynnik korelacji (r)	0,9987	0,9984	0,9991	0,9999
Zakres liniowości [mg mL <sup>-1</sup> ]	0,003–0,040	0,011–0,107	0,003–0,040	0,010–0,103
<b>Dokładność</b>				
Odzysk (95-105% wymagane) [%]	96,78	100,72	104,97	99,45
<b>Precyzja</b>				
Stężenie [mg mL <sup>-1</sup> ]	0,0300	0,1070	0,0320	0,1030
Średnia 6 pomiarów [mg mL <sup>-1</sup> ]	0,0290	0,1078	0,0336	0,1024
SD	0,0004	0,0035	0,0016	0,0044
RSD (wymagane <5%)	1,3793	3,2468	4,7619	4,2969

#### *Badania szybkości rozpuszczania*

Zmiana szybkości rozpuszczania ibuprofenu (IBU1 oraz IBU2) została zbadana poprzez wyznaczenie profili szybkości rozpuszczania, zgodnie z wymogami Farmakopei Polskiej w temperaturze 37±0,5°C w aparacie łopatkowym (Agilent 708-DS) z prędkością obrotów łopatek 50 obr min<sup>-1</sup> (Farmakopea Polska 2014). Jako medium akceptorowe zastosowano sztuczny sok żołądkowy oraz bufor fosforanowy w zakresie pH odpowiadającemu środowisku przewodu pokarmowego (pH 1,2-6,8). W odpowiednich punktach czasowych pobrano próbki płynu, w której następnie oznaczono stężenie ibuprofenu metodą HPLC-DAD. Badanie zostało przeprowadzone w „warunkach sink” tj. w taki sposób, objętość i rodzaj płynu akceptorowego nie wpływają na przebieg uwalniania, oraz obecność w płynie akceptorowym już uwolnionej substancji leczniczej nie wpływa na szybkość tego procesu.

Wyznaczone profile szybkości rozpuszczania zostały porównane statystycznie z wykorzystaniem metody współczynników  $f_1$  (różnicy) i  $f_2$  (podobieństwa) oraz porównanie ich wartości z ustalonymi wartościami progowymi. Wartości współczynników wyznaczono na podstawie poniższych równań:

$$f_1 = \frac{\sum_{j=1}^n |R_j - T_j|}{\sum_{j=1}^n R_j} \times 100$$



$$f_2 = 50 \times \log \left( \left( 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \sum_{j=1}^n |R_j - T_j|^2 \right)^{-\frac{1}{2}} \times 100 \right)$$

gdzie:  $R_t$  i  $T_t$  stanowią średni procent rozpuszczonego API w punkcie czasowym  $t$ , odpowiednio dla próby referencyjnej i testowej;  $n$  jest liczbą testowanych punktów w czasie  $t$ .

Przyjmuje się, że profile uwalniania wykazują podobieństwo, gdy wartość  $f_1$  mieści się w granicach od 0 do 15, natomiast  $f_2$  przyjmuje wartość bliską 100 (nie mniejsza od 50) (Moore and Flanner 1996).

#### *Badania przenikania przez modelowy układ błon*

Badania oceny zmian wchłaniania ibuprofenu (IBU1 oraz IBU2) samego oraz w układzie z poloksamerem zostały prowadzone z zastosowaniem równoległego testu przepuszczalności przez błony sztuczne (PAMPA, ang. *parallel artificial membrane permeability assay*), a wyniki porównane z zastosowaniem analizy wariancji ANOVA. Ocena zdolności przenikania leku przez błony biologiczne z zastosowaniem techniki PAMPA stanowi alternatywną metodę do modeli biologicznych bazujących na kulturach komórkowych (np. Caco-2).

Test PAMPA składa się z 96-dołkowych mikroplutek filtracyjnych, podzielonych na dwie komory, donorową i akceptorową, oddzielonych przez mikrofiltr o grubości 120  $\mu\text{m}$ , powlekany 20% roztworem lecytyny. Płytki inkubuje się w temperaturze 37°C przez 60 minut. Po inkubacji, płytki rozdziela się, a w części donorowej i akceptorowej oznacza się stężenie leku przy użyciu metod HPLC-DAD.

Ocenę wpływu poloksameru na przenikanie ibuprofenu określa się poprzez wyznaczenie oraz porównanie wartości pozornej przepuszczalności ( $P_{app}$ ) ibuprofenu samego oraz w układzie z poloksamerem. Pozorną przepuszczalność wyznacza się za pomocą równania:

$$P_{app} = \frac{-\ln \left( 1 - \frac{C_A}{C_{equilibrium}} \right)}{S \times \left( \frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A} \right) \times t}$$

gdzie  $V_D$  – objętość części donorowej,  $V_A$  – objętość części akceptorowej,  $C_{equilibrium}$  – stężenie równowagi  $C_{equilibrium} = \frac{C_D \times V_D + C_A \times V_A}{V_D + V_A}$ ,  $C_D$  – stężenie w części donorowej,  $C_A$  – stężenie w części akceptorowej,  $S$  – powierzchnia membrany,  $t$  – czas inkubacji (w sekundach).

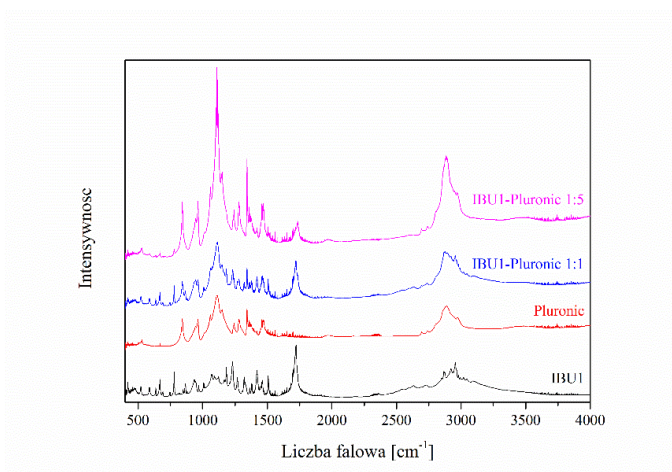
Układy, których  $P_{app} < 1 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$  klasyfikuje się jako te z niską przenikalnością, natomiast układy których  $P_{app} > 1 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$  – z wysoką (Yee 1997).

### **3. Wyniki i dyskusja**

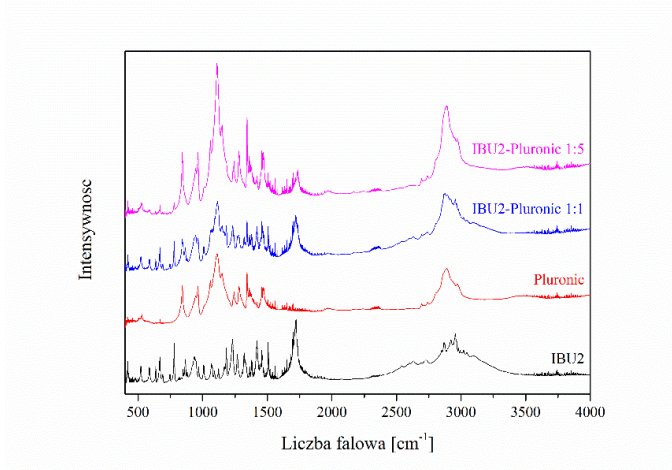
Analiza otrzymanych eksperymentalnie wyników skupiła się na ocenie oddziaływań ibuprofenu z poloksamerem w spreparowanych układach w fazie stałej oraz ocenie efektów oddziaływania ibuprofenu z poloksamerem w odniesieniu do zmian szybkości rozpuszczania oraz przenikania przez układy sztucznych błon.

Poprzez rozcieranie ibuprofenu z poloksamerem uzyskano stałe rozproszenie substancji w polimerze.

Na rys. 2-3 zostały przedstawione eksperymentalne widma FT-IR ibuprofenu (IBU1 oraz IBU2), poloksamery oraz układów ibuprofenu z poloksamerem.

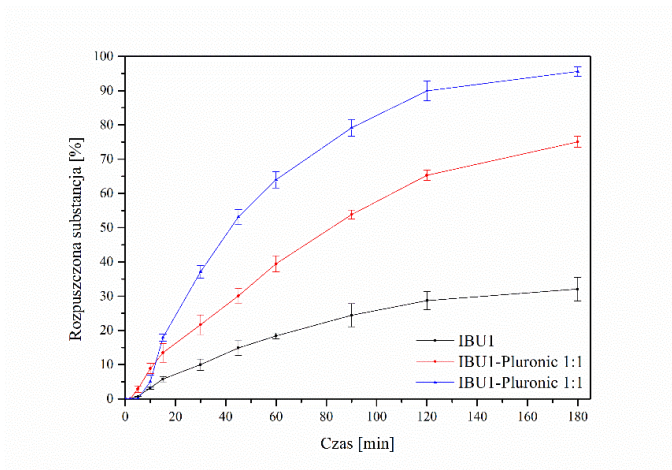


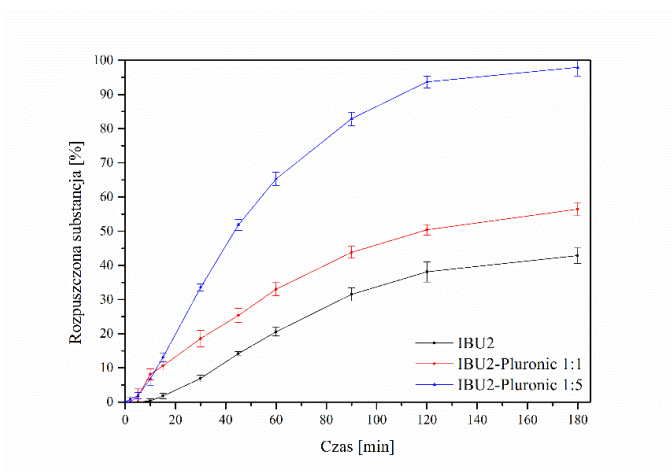
**Rys. 2.** Widmo FT-IR IBU1, poloksameru i układów IBU1-poloksamer.



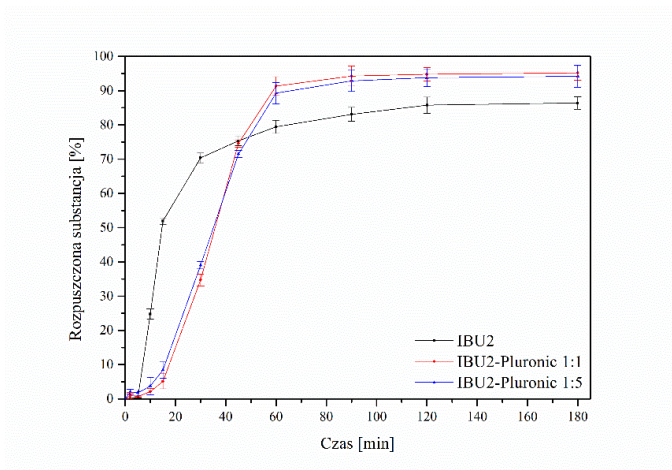
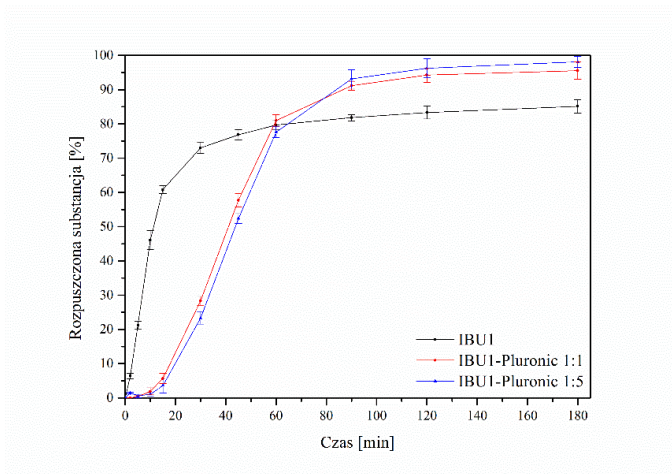
**Rys. 3.** Widmo FT-IR IBU2, poloksameru i układów IBU2-poloksamer.

Badania szybkości rozpuszczania ibuprofenu (IBU1 oraz IBU2) w formie wolnej oraz w połączeniu z poloksamerem przeprowadzono w dwóch pH symulujących warunki przewodu pokarmowego: pH 1,2 (żołądek) oraz pH 6,8 (jelito). Na rys. 4-5 przedstawiono uzyskane profile szybkości rozpuszczania.





Rys. 4. Profile szybkości rozpuszczania ibuprofenu w pH 1,2.



Rys. 5. Profile szybkości rozpuszczania ibuprofenu w pH 6,8.

Wyznaczone profile szybkości rozpuszczania ibuprofenu porównano statystycznie wykorzystaniem metody współczynników  $f_1$  (różnicy) i  $f_2$  (podobieństwa) a uzyskane wyniki przedstawiono tabelach 3-4.

**Tab. 3.** Porównanie profili szybkości rozpuszczania ibuprofenu w pH 1,2

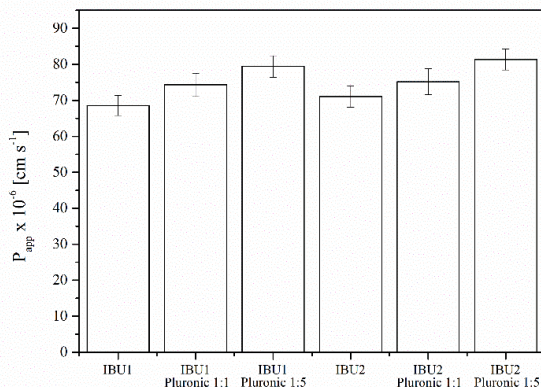
	IBU1	IBU1- Pluronic 1:1	IBU1- Pluronic 1:5	IBU2	IBU2- Pluronic 1:1	IBU2- Pluronic 1:5
IBU1	x	f <sub>1</sub> =94,70 f <sub>2</sub> =14,20	f <sub>1</sub> =90,81 f <sub>2</sub> =1,91	f <sub>1</sub> =29,61 f <sub>2</sub> =61,88	x	x
IBU1- Pluronic 1:1	f <sub>1</sub> =94,70 f <sub>2</sub> =14,20	x	f <sub>1</sub> =46,57 f <sub>2</sub> =20,12	x	x	x
IBU1- Pluronic 1:5	f <sub>1</sub> =90,81 f <sub>2</sub> =1,91	f <sub>1</sub> =46,57 f <sub>2</sub> =20,12	x	x	x	x
IBU2	f <sub>1</sub> =29,61 f <sub>2</sub> =61,88	x	x	x	f <sub>1</sub> =58,72 f <sub>2</sub> =27,89	f <sub>1</sub> =86,50 f <sub>2</sub> =2,91
IBU2- Pluronic 1:1	x	x	x	f <sub>1</sub> =58,72 f <sub>2</sub> =27,89	x	f <sub>1</sub> =81,59 f <sub>2</sub> =11,02
IBU2- Pluronic 1:5	x	x	x	f <sub>1</sub> =86,50 f <sub>2</sub> =2,91	f <sub>1</sub> =81,59 f <sub>2</sub> =11,02	x

**Tab. 4.** Porównanie profili szybkości rozpuszczania ibuprofenu w pH 6,8

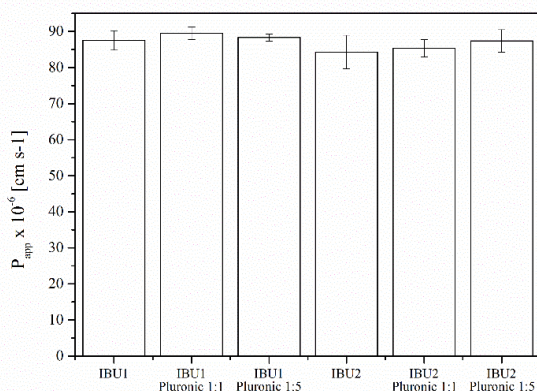
	IBU1	IBU1- Pluronic 1:1	IBU1- Pluronic 1:5	IBU2	IBU2- Pluronic 1:1	IBU2- Pluronic 1:5
IBU1	x	f <sub>1</sub> =36,17 f <sub>2</sub> =16,04	f <sub>1</sub> =39,28 f <sub>2</sub> =14,91	f <sub>1</sub> =10,84 f <sub>2</sub> =38,33	x	x
IBU1- Pluronic 1:1	f <sub>1</sub> =36,17 f <sub>2</sub> =16,04	x	f <sub>1</sub> =5,47 f <sub>2</sub> =78,04	x	x	x
IBU1- Pluronic 1:5	f <sub>1</sub> =39,28 f <sub>2</sub> =14,91	f <sub>1</sub> =5,47 f <sub>2</sub> =78,04	x	x	x	x
IBU2	f <sub>1</sub> =10,84 f <sub>2</sub> =38,33	x	x	x	f <sub>1</sub> =26,51 f <sub>2</sub> =35,75	f <sub>1</sub> =24,82 f <sub>2</sub> =36,74
IBU2- Pluronic 1:1	x	x	x	f <sub>1</sub> =26,51 f <sub>2</sub> =35,75	x	f <sub>1</sub> =4,03 f <sub>2</sub> =94,02
IBU2- Pluronic 1:5	x	x	x	f <sub>1</sub> =24,82 f <sub>2</sub> =36,74	f <sub>1</sub> =4,03 f <sub>2</sub> =94,02	x

We wszystkich badanych układach oraz we wszystkich pH, zaobserwowano statystycznie istotny wzrost szybkości rozpuszczania ibuprofenu po wprowadzeniu go do systemu z poloksamerem. Wszystkie porównywane profile szybkości rozpuszczania ibuprofenu, oprócz IBU2-Pluronic 1:1 vs IBU2-Pluronic 1:5 w pH 6,8, różniły się statystycznie.

Badania przenikania przez układ sztucznych błon zostały przeprowadzone z zastosowaniem systemu PAMPA. Wartości pozornej przepuszczalności ( $P_{app}$ ) ibuprofenu zostały przedstawione na rys. 5-6.



Rys. 5. Wartości pozornej przepuszczalności ibuprofenu w pH 1,2.



Rys. 6. Wartości pozornej przepuszczalności ibuprofenu w pH 6,8.

Uzyskane wartości pozornej przepuszczalności ibuprofenu porównano statystycznie z wykorzystaniem analizy wariancji ANOVA, obserwowany poziom istotności p (p-value) porównano z wartością p dla zadanego poziomu istotności  $\alpha$  ( $\alpha=0,05$ ) oraz przedstawiono w tabelach 5-6.

Tab. 5. Wartości obserwowanego poziomu istotności p dla wartości pozornej przepuszczalności ibuprofenu w pH 1,2.

	IBU1	IBU1-Pluronic 1:1	IBU1-Pluronic 1:5	IBU2	IBU2-Pluronic 1:1	IBU2-Pluronic 1:5
IBU1	x	0,2763	0,0105	0,9147	0,1710	0,0031
IBU1-Pluronic 1:1	0,2763	x	0,3871	0,7861	0,9994	0,1284
IBU1-Pluronic 1:5	0,0105	0,3871	x	0,0548	0,5621	0,9684
IBU2	0,9147	0,7861	0,0548	X	0,6045	0,0151
IBU2-Pluronic 1:1	0,1710	0,9994	0,5621	0,6045	x	0,2121
IBU2-Pluronic 1:5	0,0031	0,1284	0,9684	0,0151	0,2121	x

\* w ostatnim punkcie czasowym (180 min)

**Tab. 6.** Wartości obserwowanego poziomu istotności p dla wartości pozornej przepuszczalności ibuprofenu w pH 6,8

	IBU1	IBU1- Pluronic 1:1	IBU1- Pluronic 1:5	IBU2	IBU2- Pluronic 1:1	IBU2- Pluronic 1:5
IBU1	x	0,9483	0,9992	0,7377	0,9338	1,0000
IBU1- Pluronic 1:1	0,9483	x	0,9943	0,2871	0,5089	0,9338
IBU1- Pluronic 1:5	0,9992	0,9943	x	0,5428	0,7981	0,9984
IBU2	0,7377	0,2871	0,5428	X	0,9968	0,7675
IBU2- Pluronic 1:1	0,9338	0,5089	0,7981	0,9968	x	0,9482
IBU2- Pluronic 1:5	1,0000	0,9338	0,9984	0,7675	0,9482	x

\* w ostatnim punkcie czasowym (180 min)

W przypadku badań przenikania przez modelowy układ sztucznych błon, tylko w przypadku układu z poloksamerem w stosunku 1:5 w pH 1,2 zanotowano statystycznie istotny wzrost przenikalności ibuprofenu.

#### 4. Wnioski

Poloksamer powoduje statystyczny wzrost szybkości rozpuszczania ibuprofenu w szerokim zakresie pH płynów akceptorowych. Wzrost szybkości rozpuszczania ibuprofenu dodatkowo spowodował zmiany przenikalności przez układ sztucznych błon, lecz te zmiany nie były istotne statystycznie (poza przenikaniem układu ibuprofen-poloksamer 1:5 w pH 1,2).

#### 5. Literatura

- Farmakopea Polska, wyd. X (2014) Uwalnianie substancji czynnej ze stałych postaci leku. 387–392.
- FDA (2015) Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System.
- Foster B, Cosgrove T, Hammouda B (2009) Pluronic Triblock Copolymer Systems and Their Interactions with Ibuprofen. *Langmuir* 25(12): 6760–6766.
- Giliyar C, Fikstad DT, Tyavanagimatt S (2006) Challenges and opportunities in oral delivery of poorly water-soluble drugs. *Drug Delivery Technology* 6: 57–163.
- ICH (International Conference on Harmonisation) Harmonised Tripartite Guideline (2005) Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1).
- Moore JW, Flanner HH (1996) Mathematical Comparison of curves with an emphasis on in vitro dissolution profiles. *Pharm Tech* 20(6): 64–74.
- Sznitowska M, Kaliszan R (2014) *Biofarmacja*. Elsevier Urban & Partner.
- Yee S (1997) In vitro permeability across Caco3 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man - fact or myth. *Pharmaceutical Research* 14:763–766.

#### 6. Podziękowania

Badania finansowane ze środków na prowadzenie badań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nimi związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktorskich (502-14-03305411-41257).

## 12. Glycosaminoglycans mediate the function of cathepsin proteases

Bojarski Krzysztof K., Samsonov Sergey A.

Laboratory of Molecular Modeling, Faculty of Chemistry, University of Gdańsk

Bojarski Krzysztof K.: krzysztof.bojarski@ug.edu.pl

Key words: proteases, zymogen processing, inhibition by carbohydrates

### Abstract

Cathepsins are lysosomal proteases found in all animals as well as in the other organisms. They have a vital role in diverse of biological processes such as bone resorption, intracellular proteolysis and regulation of programmed cell death. Changes in their activity in organism may lead to many serious diseases, either to pycnodysostosis in case of deficiency or to osteoporosis in case of excessive activity. Enzymatic activity of the cathepsins can be moderated by glycosaminoglycans – group of linear, periodic, negatively charged carbohydrates. However, the underlying molecular mechanisms of this mediation are complex and not completely elucidated.

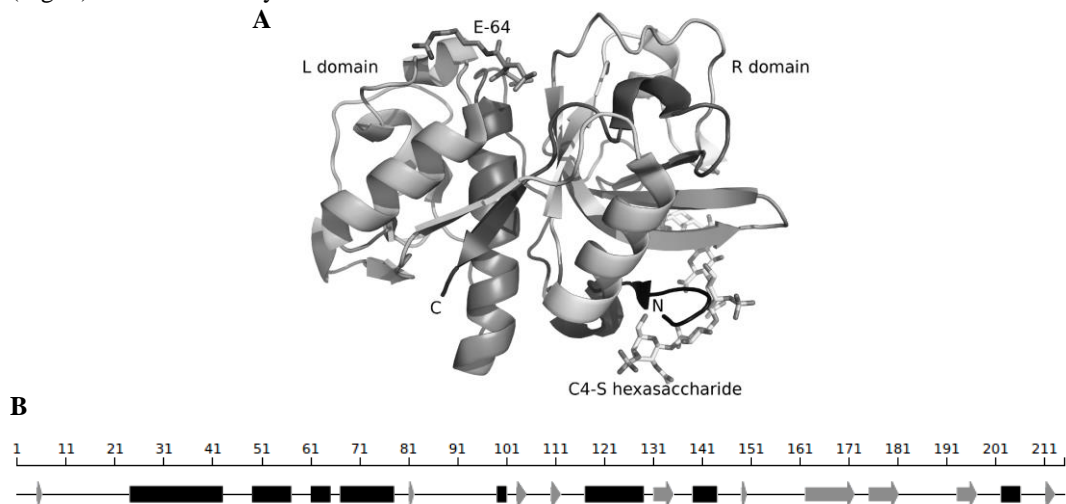
### 1. Introduction

Cathepsins are protein-degrading enzymes that can be found in many living organisms. Most of them are cysteine proteases (Enzyme Commission number - EC 3.4.22) but are also cathepsins A and G which are serine proteases (EC 3.4.21) or cathepsins D and E which are aspartyl proteases (EC 3.4.23). To date we know that there are 15 members of this family with most of their structures known (Tab. 1). Regardless differences in their aminoacid sequences cathepsins share the same secondary structure pattern which is reflected in the same fold.

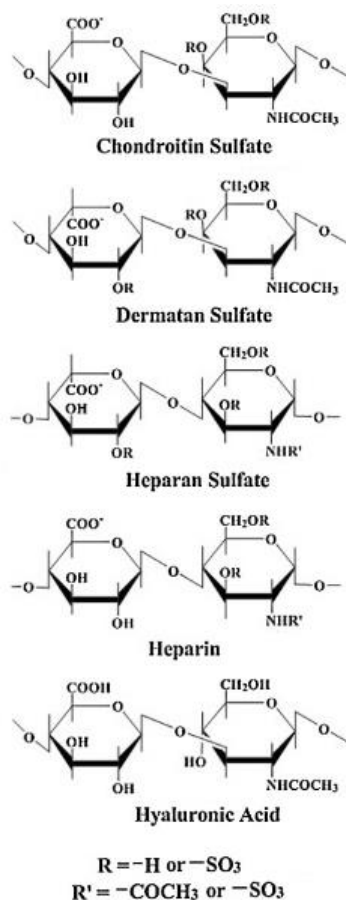
**Tab. 1.** Experimental structures of human cathepsins and their mutants deposited in the PDB.

Cathepsin	Number of structures in the PDB
cathepsin A	11
cathepsin B	11
cathepsin C	10
cathepsin D	6
cathepsin E	2
cathepsin F	2
cathepsin G	4
cathepsin H	0
cathepsin K	52
cathepsin L (L1)	33
cathepsin O	0
cathepsin S	32
cathepsin W	0
cathepsin V (L2)	3
cathepsin Z	2

This similarity in secondary structure of cathepsins could imply that they share some properties, one of which is localisation of the active site. It is positioned in cleft between two domains (Fig. 1) and consist of cysteine and histidine residues.



**Fig. 1:** (A) Experimental structure of cathepsin K (in cartoon) in complex with C4-S hexasaccharide and E-64 inhibitor (in sticks). (B) Cathepsin K secondary structure.



**Fig. 2.** Structure of the disaccharide units of GAGs (Wang et al. 2017).



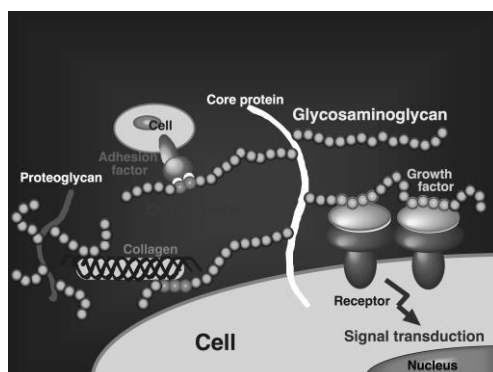
Cathepsins play vital role in mammalian cellular turnover, for example, in bone resorption (Brömme *et al.* 1995). They degrade polypeptides and are distinguished by their substrate specificities (Turk *et al.* 2000). Disruptions of their activity may lead to many serious diseases such as cancer, stroke or Alzheimer’s disease. (Gelb *et al.* 1996).

Cathepsins form complexes with various compounds. One of the most important are glycosaminoglycans (GAGs). GAGs are a group of linear, negatively charged polisacharydes (Esko JD *et al.*). Each GAG consists of a recurring disaccharide unit in which one aminosugar and one uronic acid are present. GAGs are classified into several groups: chondroitin sulfate (C4-S, C6-S), dermatan sulfate (DS), hyaluronic acid (HA) and heparin (HE). These GAGs have regular disaccharide unit, however for heparan sulfate (HS), disaccharide unit is variable in terms of sulfation pattern and monomeric components (Tab. 2). Alzheimer’s disease. (Gelb *et al.* 1996).

**Tab. 2:** Composition and charge of GAG disaccharide periodic units.

Glycosaminoglycan	Disaccharide periodic unit	Disaccharide periodic unit charge
chondroitin sulfate (C4-S, C6-S)	GalNAc-GlcUA	-2
dermatan sulfate (DS)	GalNAc-IdoUA	-2
hyaluronic acid (HA)	GlcNAc-GlcUA	-1
heparin (HE)	GlcNS(6S)-IdoUA(2S)	-4
heparan sulfate (HS)	Derivatives of HE	-1, -2, -3, -4

GAGs are located in the extracellular matrix (Fig. 3). They are involved in many cellular processes including cell proliferation, angiogenesis, anticoagulation, adhesion and signalling cascades (Bishop *et al.* 2007). It is suggested that GAGs may play vital role in medical treatment of disorders associated with disruptions of the above mentioned processes (Turk *et al.* 2006). It is known, that formation of cathepsin-GAG complexes may result in inhibition of the protein activity. Therefore, it is important to understand molecular mechanisms related to those complexes and defining their functions.



**Fig. 3:** GAGs in the extracellular matrix (Yamada *et al.* 2016).

## 2. How cathepsin proteases are studied?

**The X-Ray crystallography** is one of experimental methods that uses X-Ray radiation for determining the atomic and molecular structure of a crystallized molecule. The main principle of this

technique is to diffract X-Ray beam upon its collision with atoms into smaller beams and then to measure the angles and intensities of these diffracted beams in order to produce a three-dimensional picture of density of electrons within the crystal. Assigning electron densities to the individual atoms allows to obtain atomic structure of the molecule. Drawbacks of this method are high cost of the single experiment and the necessity of having a crystal of compound, which is not always a trivial procedure.

**Nuclear Magnetic Resonance (NMR)** spectroscopy is another experimental technique that is used to determine the structure of a molecule by exploiting properties of certain atomic nuclei. It is used to obtain informations about structural and dynamical characteristics of chemical compounds, their reaction state and chemical environment. The intramolecular magnetic field around an atom in a molecule changes the resonance frequency depending on its chemical environment, thus giving access to details of the electronic structure of a molecule and its individual functional groups. NMR spectroscopy is widely used in organic chemistry in confirming the identity of a substance. The biggest drawbacks of this methods are requirement of a relatively large amount of a purified substance in order to run experiment as well high cost of NMR apparatus.

**Surface Plasmon Resonance (SPR)** is a technique that uses resonant oscillation of conduction electrons at the interface between negative and positive permittivity materials stimulated by incident light. SPR is the basis of many standard tools for measuring adsorption of material onto planar metal (typically gold or silver) surfaces or onto the surface of metal nanoparticles. It is the fundamental principle behind many colour-based biosensor applications and different lab-on-a-chip sensors. In order to study binding between two molecules by SPR the receptor is adsorbed on the surface and ligand is added gradually. The main idea of SPR measurement is that the immobilized receptor and a complex made up of this receptor and a bound ligand adsorb and reflect incident radiation differently which results in diverse value of reflection angle allowing to observe formation of the complex. Adding ligand to the receptor leads to increase in the SPR signal and adding solution including dissociation agent after desired association time causes a decrease of the SPR signal.

**Fluorimetric Assay** is one of the methods used to measure enzymatic activity. It allows to obtain informations about enzyme kinetics and enzyme inhibition. The main principle of this method is that the substrate and the product have different adsorption spectra, therefore adding substrate allows to observe the changes in specific signals. These assays are in general much more sensitive than spectrophotometric assays, but can suffer from interference caused by impurities and the instability of many fluorescent compounds when exposed to light.

**Molecular Docking** is a computational method that allows to predict preferred orientation of the ligand to the receptor when they are not bound covalently. Knowledge of the preferred orientation, in turn, may be used to predict the binding affinity between two molecules using, for example, various scoring functions. Its ability to predict the binding conformation of a ligands to the appropriate target binding site on the protein surface makes this method one of the most frequently used when experimental structure is unknown. The aim of molecular docking is to achieve an optimal conformation and relative orientation of protein and ligand such that the free energy described by scoring functions of the overall system is minimised.

**Molecular Dynamics (MD)** is another computational method which can be used to study cathepsin-GAG complexes. It allows to study the evolution of molecular systems in time. In such simulations all atoms and molecules are allowed to interact for period of time, giving a view of the dynamic evolution of the system (trajectories). In most cases the molecular trajectories are determined by numerically solving Newton's equations of motion for a system of interacting particles where forces between the particles and their potential energies are calculated by using specific interatomic potentials which are defined by the force fields. MD is an appropriate method to determine the properties of systems complexed enough so they could not be examined analytically giving

informations about compound at atomic level, something that cannot be achieved with experimental approach.

### 3. What is the role of GAGs in the molecular mechanisms of cathepsin proteases?

#### 3.1 Crystal structure of cathepsin K in complex with chondroitin sulfate and its implications for collagenase activity

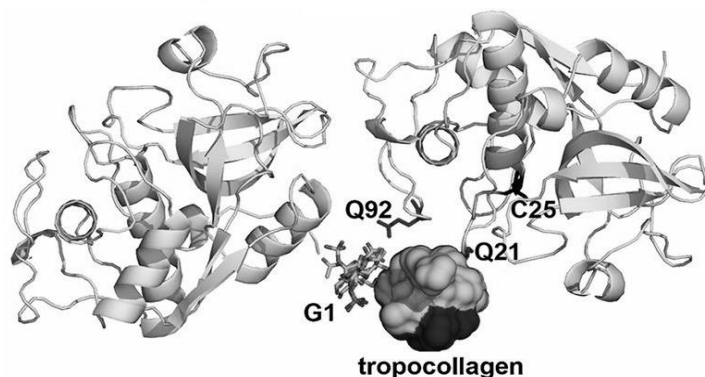
Among all human cathepsins, only cathepsin K exhibits collagenase activity, hence it is a high interest in explaining this phenomenon at the structural level. The knowledge of the way how cathepsin K degrades collagen may help in development of the solutions for monitoring its activity. This may lead to discovery of the novel curation for pycnodysostosis (lack of cathepsin K activity) or osteoporosis (excessive activity of cathepsin K).

Collagenase activity of cathepsin K requires the formation of high molecular mass complexes with bone associated GAGs such as chondroitin 4-sulfate (C4-S). In order to understand how cathepsin K degrades collagen, a structure of one of those complexes was required (Fig. 4A). The first experimental structure was obtained by X-ray crystallography for cathepsin K and C4-S in 1:n complex suggesting that one C4-S molecule can bind many cathepsin K molecules (Li *et al.* 2008). Experiment was made with the use of fluorospectroscopic monitoring of the examined complex. In this test fluorimetric assay was developed which allowed to observe difference in the fluorescence between substrate and product. Since the substrate and the product have different adsorption spectra, adding C4-S allowed to observe the changes in specific signals. Results revealed that C4-S binds to a positively charged surface on the back side of the R domain of the cathepsin K molecule, allowing interactive partners to bind in the enzyme's active site.

A



B



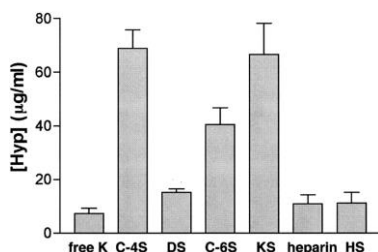
**Fig. 4:** (A) Structure of cathepsin K in complex with C4-S and E64 inhibitor (left, PDB ID: 3C9E) and in complex with C4-S only (right, PDB ID: 4N8W). The cathepsin K is shown in secondary structure representation, while C4-S and E64 are in sticks representation. (B) Cathepsin K (in cartoon)

dimer-tropocollagen (in surface) model in complex with GAG chain G1 (in sticks), (Aguda et al. 2014).

On the other hand, the analysis of the collagenase activity of cathepsin K at stoichiometric concentrations required to form previously mentioned complex did not yield the results which were able to explain significant cathepsin K collagenase activity. This leads to suggestion that different complex of cathepsin K and C4-S must be responsible for collagen degradation, hence the new structure was obtained and analysed (Aguda *et al.* 2014). This time cathepsin K-C4-S complex was crystallized in the absence of E-64 inhibitor which resulted in small difference between previously proposed structure and current one in terms of C4-S orientation. In the case of 3C9E GAG was cosine-curved shaped, while in 4N8W it was more extended conformation (Fig. 4A). The structure from the 4N8W suggests that cathepsin K dimer associated with collagen-bound GAGs was identified, which acts as the active collagenase form (Fig. 4B). This results provided a mechanism of collagen fiber degeneration in three steps: 1) binding of cathepsin K monomers to GAGs associated with collagen fibrils; 2) recruitment of a second cathepsin K molecule to form dimer at the edges of the gap regions of fibrils and finally; 3) cleavage at the N- and C- termini of surface tropocollagen molecules and their release from the fibril. Those collage fragments would be subsequently degraded by cathepsin K.

### 3.2 Enzymatic activity of cysteine cathepsins

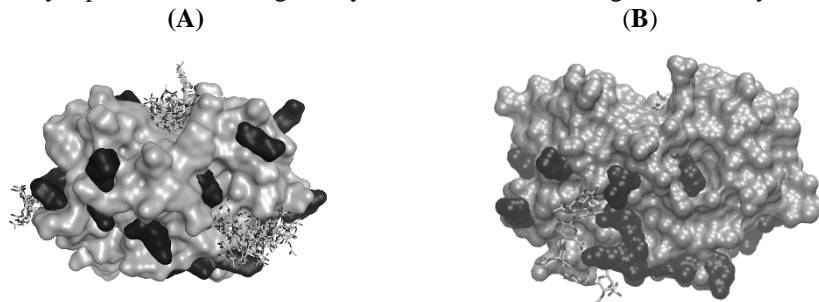
Previous studies on various cathepsin-GAG complexes investigated by Li *et al.* (2004) showed that GAGs play a key role in regulation of enzymatic activity of cathepsins. Experimental results demonstrate that cathepsin K and C4-S complex is unique and not formed by other closely related cathepsins B, L, S and F. Moreover, cathepsin K binds with other GAGs: C6-S (chondroitin 6-sulfate), DS, KS (keratan sulfate), HS and HE. In contrast to cathepsin K, cathepsins B and F did not reveal any detectable collagenase activities regardless of C4-S presence. Cathepsins S and L displayed weak to moderate triple-helical collagenolytic activities which increased at higher temperature in the absence of C4-S suggesting a different cleavage mechanism. Additionally, C4-S presence in cathepsins L and S lead to suppression of their collagenolytic activity regardless of temperature of their solutions. This suggested that some GAGs have opposite effect on the collagen-cleaving capability of closely related cysteine proteases. Analysis of the effect of different GAGs on cathepsin K revealed that not only C4-S can improve collagenolytic activity of cathepsin K but also C6-S and KS. Those GAGs are predominantly expressed in bone and cartilage. On the other hand, DS, HS and HE also form stable complexes with cathepsin K but do not improve collagenolytic activity (Fig. 5). At the same time catalytic site of cathepsin K in those complexes is not affected, indicating a putative allosteric regulation mechanism (see section 3.4).



**Fig. 5:** Comparison of the relative hydrolysis rates of insoluble type I collagen by cathepsins K in presence C4-S, DS, C6-S, KS, HE and HS. The collagenase activity was measured by determining the content of hydroxyproline in soluble collagen fragments (Li et al. 2004).

Similar to C4-S, HS is capable of reduction of the level of collagenase activity of the cathepsin S but to a less extent. This effect can be reversed with presence of NaCl meaning the interactions between GAGs and the cathepsin are electrostatics-driven. In contrast to cathepsin K, HA

and DS also slightly enhanced degeneration of type IV collagen by cathepsin S. Those results suggest that the degree of sulfation and/or GAG type may be important for promoting a decrease in the type IV collagenase activity of cathepsin S. It is worth to note that interactions in cathepsin K-GAG and cathepsin S-GAG complexes are different. This was examined by Sage *et al.* (2013): in this work, putative C4-S binding sites in cathepsin S were identified (Fig. 6). Those sites are different than in the previously discussed cathepsin K-C4-S complex. That allowed to propose that C4-S binding to cathepsin S may represent a novel regulatory mechanism of its collagenase activity.

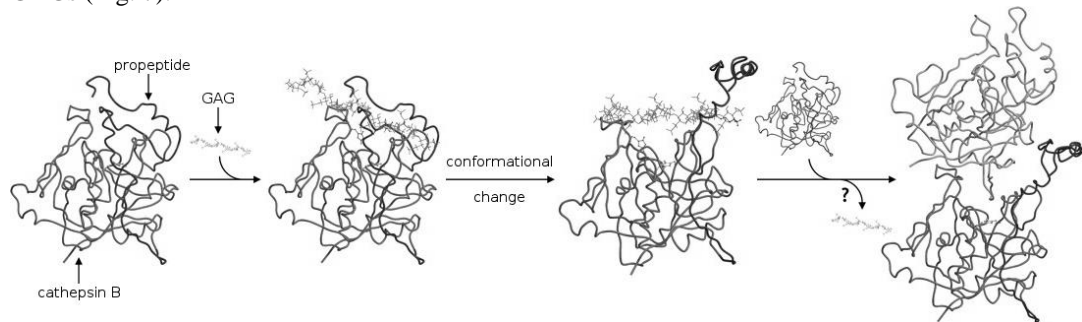


**Fig. 6:** (A) Putative C4-S binding sites in cathepsin S proposed by molecular docking. The clusters of C4-S solutions are represented by sticks, while the cathepsin S is presented in surface. (B) Cathepsin K structure in complex with E-64 inhibitor in active site and with C4-S (PDB ID: 3C9E).

### 3.3 Effect of GAGs on procathepsins processing

Cysteine cathepsins are synthesized as inactive proenzymes. The propeptide which is removed in endoplasmatic reticulum plays role as a signal peptide. The propeptide facilitates folding of the enzyme, acts as an inhibitor preventing inappropriate proteolytic activity of the proenzyme and is responsible for targeting to endosomes and/or lysosomes. The propeptide, which runs in an extended conformation through the active site cleft, forms an  $\alpha$ -helical domain on top of the enzyme, which serves to anchor the prodomain to the body of the enzyme. Procathepsins such as procathepsins B, L, S and K are endopeptidases and, therefore, can be activated automatically or by other proteases like cathepsin D or pepsin, while procathepsins X and C are exopeptidases and require other proteases.

With the use of fluorescence spectroscopy experiment it was examined that HE, HS and CS are capable of accelerating procathepsin B processing by Caglič *et al.* (2007). Regardless of which GAG was interacting with procathepsin B, results were very similar suggesting that structure of carbohydrate backbone is not important for this accelerating effect. Moreover, no correlation between the degree of sulfation and procathepsin B processing rate was observed. It was also observed that HA was less efficient in promoting proenzyme processing leading to statement that sulfation of GAG is important but not crucial. Last but not least, interactions with procathepsin B requires only a tetrasaccharide for optimal interaction. It is in opposite to most of other cases where at least a tetra- to octasaccharide is required for specific binding on protein-GAG systems (Samsonov *et al.* 2016). Those results allow to propose a novel mechanism of procathepsin B auto-activation in presence of GAGs (Fig. 7).

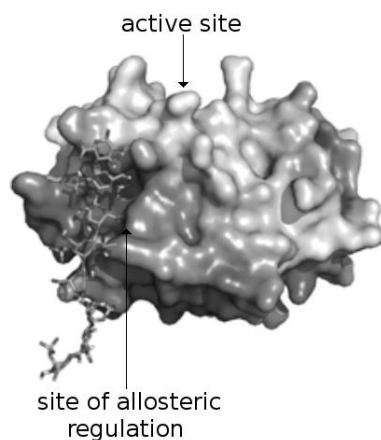


**Fig. 7:** Mechanism of procathepsin B auto-activation in the presence of GAGs. A GAG molecule binds to a procathepsin molecule. GAG binding induces conformational change in procathepsin B,

which exposes and enables access of a substrate molecule to the active site, which in the case of autoactivation is another procathepsin B molecule, to the active site cleft (Caglič et al. 2007).

#### 3.4 Conformational flexibility of cathepsin K and its regulation by GAGs binding – allostery

Cathepsin allostery is a change in active site geometry due to binding allosteric regulator in a different site. Novinec *et al.* (2010) investigated that cathepsin K can change its conformation upon binding GAG with the use of fluorescence spectroscopy, molecular docking and MD. In this experiment cathepsin K was added to a mixture of substrate and the inhibitor. Because in this experiment the enzyme was in the tense state (state with lower substrate affinity and lesser susceptibility to reverse or irreversible inhibition) under these conditions, the inhibitor bound only weakly. Adding GAG into the mixture composed of cathepsin K, substrate and inhibitor caused a change in the enzyme conformation, resulting in the rapid binding of the inhibitor. This experiment implies that another complex between cathepsin K and GAG has to be formed in order to inhibit the enzyme. It was tested with the use of molecular docking: obtained model of the complex was compared with X-ray crystallographic structure of cathepsin K-GAG complex (Li *et al.* 2008). A rearrangement of the CS chain occurred upon binding to the enzyme was observed. This indicates that the slow activation of cathepsin K is a result of a slow conformational change of CS, which allows for the formation of a more tightly bound complex between enzyme and GAG (Fig. 8). Therefore, allosteric regulation represents another mechanism of GAGs mediated regulation of the cathepsins activity.



**Fig. 8:** Complex of the cathepsin K (in surface representation, coloured according to the electrostatic potential) with DS octasaccharide (consisting of four 4-sulfo-N-acetylgalactosamine-iduronic acid disaccharides; shown as sticks). The binding is proposed to proceed via a slow conformational adaptation of the GAG to the structure of cathepsin K. Cathepsin K active site and proposed GAG allosteric site are shown with black arrows (Novinec et al. 2010).

#### 4. Summary

In this paper we have summarised briefly the present knowledge on cathepsin-GAG interactions. Cathepsins are lysosomal proteases that play a key role in many crucial biological processes. They can bind GAGs – periodic, linear, negatively charged oligosaccharides. GAGs can moderate cathepsins activity by activating or inhibiting them. However, there are still many questions open about those complexes. These questions represent actual challenges for the further research of cathepsin-GAG systems:

- If GAGs can bind to an alternative part of cathepsins than their active site resulting in an allosteric change?
- If there are other indirect ways of inhibiting cathepsins by GAGs?

- How we could make use of these data in the future for medical applications in the area of regenerative medicine?

## 5. Acknowledgement

This work was supported by the National Science Center of Poland (Narodowy Centrum Nauki, grant UMO-2016/21/P/ST4/03995; This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 665778). The authors would like to thank Artur Giełdoń for fruitful discussions.

## 6. Literature

- Aguda AH, Panwar P, Du X et al. (2014) Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America 111(49): 17474-17479
- Bishop JR, Schuksz M, Esko JD (2007) Nature 446: 1030-1037
- Brömme D, Okamoto K, Wang BB et al. (1995) Biological Chemistry 376: 379-384
- Caglić D, Pungerčar JR, Pejler G et al. (2007) Journal of Biological Chemistry 282: 33076-33085
- Esko JD et al. (2009) Essentials of Glycobiology 2nd edition, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, chapter 16
- Gelb BD, Shi GP, Chapman HA et al. (1996) Science, 273: 1236-1238
- Li Z, Yasuda Y, Li W et al. (2004) Journal of Biological Chemistry 279(7): 5470-5479
- Li Z, Kienetz M, Cherney MM et al. (2008) Journal of Molecular Biology 383: 78-91
- Novinec M, Kovačič L, Lenarčič B et al. (2010) Biochemical Journal 429(2): 379-389
- Sage J, Mallèvre F, Barbarin-Costes F et al. (2013) Biochemistry, 52(37): 6487-6498
- Samsonov SA, Pisabarro MT (2016) Glycobiology 26(8): 850-861
- Turk B, Turk D, Turk V (2000) Biochimica et Biophysica Acta 1477: 98-111
- Turk B (2006) Nature Reviews Drug Discovery 5: 785-799
- Wang M, Liu X, Lyu Z et al. (2017) Elsevier, 150: 175-182
- Yamada, Shuhei, Toyoda et al. (2016). GlycoPOD <http://jcggdb.jp/GlycoPOD>. Web.5,12,2017

### **13. Programmable site-specific nucleases for target genome engineering**

Magdalena Hryhorowicz<sup>(1)</sup>, Natalia Mazurkiewicz<sup>(1)</sup>, Joanna Zeyland<sup>(1)</sup>, Agnieszka Nowak-Terpiłowska<sup>(1)</sup>, Ryszard Słomski<sup>(1,2)</sup>, Daniel Lipiński<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Agronomy and Bioengineering, Poznan University of Life Sciences

<sup>(2)</sup> Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan

Magdalena Hryhorowicz: magdalena.hryhorowicz@gmail.com

Keywords: ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9, genome editing

#### **Abstract**

The potential for precise genome modification is a breakthrough achievement of genetic engineering. Precise changes in the genome are made possible thanks to the application of site-specific nucleases, composed of a DNA-binding domain and the nucleolytic domain of restriction enzymes, which are responsible for the recognition and introduction of desirable changes in the genome. Site-specific nucleases include zinc finger nucleases (ZFN), transcription activator-like effectors (TALE) and nucleases derived from the bacterial CRISPR/Cas system, i.e. clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR and CRISPR-associated, Cas. Modification may be introduced at a specific genomic locus thanks to cellular repair processes of double strand breaks (DSB) induced by site-specific nuclease.

#### **1. Introduction**

Although we have been able to alter the nucleotides sequence in genes of various organisms, exceptionally precise tools such as programmable nuclease have been discovered only recently, facilitating efficient and specific genome modification. Previously used methods of inactivation or insertion of additional genes to animal and plant genomes consisted in DNA modification in cells using homologous recombination. The primary drawback of these methods was connected with the low efficiency of transgene integration at a specific locus. Further studies showed that double-strand breaks (DSB) within a target sequence extremely increase the frequency of homologous recombination (Rudin et al.1989). Genome modifications are mediated by programmed nucleases, which catalyze double-strand breaks resulting in specific changes within the genome. Double-strand breaks in eukaryotic cells may be repaired in two ways: by strand binding in non-homologous end joining (NHEJ) or by homologous recombination (HR) (Kakarougkas et al. 2014). Repair provided by non-homologous end joining may lead to an alteration of the original nucleotide DNA sequence or to the formation of indel (insertion/deletion) mutations. As a consequence these changes may lead to the frameshift mutation and the appearance of premature termination codons terminating translation. Although transcription may run undisturbed, no functional protein is formed. This mechanism may be used to inactivate selected genes. In turn, an alternative mechanism to repair DSB is based on homologous recombination and requires the presence of a donor template containing a homologous DNA sequence to the DSB site. This mechanism may be used to introduce specific changes at a locus: point mutations (repair of undesirable mutations - targeted gene correction or introduction of new targeted mutations), insertions (e.g. insertion of a transgene) or precisely defined deletions. Among site-specific nucleases we may distinguish zinc finger nucleases (ZFN), transcription activator-like effectors (TALE nucleases) as well as nucleases derived from the bacterial CRISPR/Cas system, i.e. clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR; CRISPR-associated, Cas) (Sega and Linkiewicz 2014, Hryhorowicz et al. 2017).

#### **2. Site-specific nucleases**

##### ZFN

Zinc finger nucleases are fusion proteins formed when the DNA binding domain with the zinc finger motif fuses with the DNA-cleaving nucleolytic domain of the IIS, FokI, restriction



enzyme. The zinc finger is composed of two antiparallel  $\beta$ -sheets and one  $\alpha$ -helix. A zinc ion found at the catalytic center plays an essential role for the functionality and stability of the domain. Individual zinc fingers are responsible for the recognition of three neighboring nucleotides. They exhibit full functionality as monomers, thus promoting fusion of several zinc fingers depending on the nucleotide sequence. This facilitates recognition of longer nucleotide sequences. However, binding of individual monomers depending on the sequence is not accidental. Selection of zinc fingers is important due to differences in DNA binding efficiency and specificity. ZFN nucleases are also equipped with the FokI domain, responsible for DNA hydrolysis and active only in the dimer form. At binding of two FokI monomers the DNA is cleaved and a DNA double-strand break develops. To generate strand breaks in the DNA helix, a ZNF pair is required, in which each of the DNA binding domains recognizes a sequence of 9-18 base pairs (Gaj et al. 2012, Chandrasegaran and Carroll 2016). As a rule it is difficult, time-consuming and costly to design ZFNs recognizing a specific sequence, since it is connected with the need to create a separate pair of proteins for each targeted sequence.

#### TALEN

TALEs are proteins naturally occurring in bacteria from the genus *Xanthomonas*, which are plant pathogens using TALE proteins to regulate transcription in host cells. When infecting a plant bacteria from the genus *Xanthomonas* transport to the plant cells exogenous proteins, the so-called activating transcription factors. The natural process consists in the recognition of the target DNA sequence in the host genome by respective domains and activation of expression of genes needed for the pathogen to spread and replicate. The DNA binding domain of the TALE protein is composed of around a dozen to several dozen repeats of a sequence of 33-35 amino acids, of which each segment is responsible for the recognition of a single base pair within DNA. Thanks to the simple code involved in the recognition of individual nucleotides in DNA, the TALEN-based technology is highly effective in the formation of functional nucleases. TALEN proteins formed by adding a nucleolytic domain to the DNA binding domain, similarly as ZFN, are constructed as dimers (to exhibit catalytic activity they require dimerization of the FokI monomer pair) (Gaj et al. 2012, Chandrasegaran and Carroll 2016). TALENs are slightly easier to design and synthesize in comparison to ZFN. However, both enzyme classes still have one basic disadvantage: when attempting to produce an enzyme cleaving a specific nucleotide sequence, each time a completely new protein needs to be designed and synthesized. It is costly and time-consuming, which is one of the greatest limitations for the common application of these proteins in laboratories.

#### CRISPR/Cas9 system

A breakthrough in genome editing was provided by the application of the CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated) system, in which the specificity of DNA recognition is not provided by a protein, as it is the case in ZFN or TALEN, but a short, complementary RNA molecule. The system uses elements of the acquired resistance mechanism, found in bacteria and archaeons, acting against phage infection and transformation mediated by foreign genetic material. While there are several types of CRISPR/Cas found in prokaryotes, genomic engineering uses tools based on the type II CRISPR system. In contrast to types I and III, which require polysubunit protein complexes to function properly, the type II is based on a single nuclease, Cas9. This protein is a large, monomeric DNA nuclease targeting the nucleotide sequence of the target locus. Type II CRISPR/Cas uses small RNA molecules (CRISPR RNA- crRNA and transactivating crRNA- tracrRNA) to precisely target Cas9 to a specific locus in the genome (Jinek et al. 2012). This system may be simplified using chimeric RNA (defined as a single-guide RNA- sgRNA or guide RNA- gRNA), constituting a junction of crRNA with tracrRNA. As a result, in order to induce DSB formation at a selected locus in the genome using the CRISPR/Cas9 system, endonuclease Cas9 and sgRNA need to be introduced into the cell. Most frequently either a plasmid coding both elements or RNA after in vitro transcription are used for that purpose. The sgRNA sequence responsible for the recognition of target DNA comprises twenty nucleotides at its 5' end. Moreover, successful recognition and binding of endonuclease Cas9 is dependent on the short PAM sequence (Protospacer Adjacent Motif), located immediately downstream from the targeted sequence (for the system using nuclease Cas9 from *Streptococcus pyogenes* 5'-NGG is the required PAM

sequence). Advantages of the CRISPR/Cas9 system include its high specificity and easy construct design. Additionally, the CRISPR/Cas system facilitates simultaneous transcription of many crRNAs, and as a result – simultaneous targeting of many loci (Cong et al. 2013). Thanks to this advantage we may reduce both the financial costs and the time required to complete the procedure. Moreover, in contrast to ZFN or TALEN, the Cas9 protein is capable of cleaving methylated DNA. As a result the CRISPR/Cas system based on the natural bacterial immune system is most universally applied by researchers and it has become the technique of choice when generating genetically modified plants and animals, while it has also facilitated highly efficient genome editing of human embryos *in vitro* (Nemudryi et al. 2014). Using the CRISPR/Cas9 technology in genome editing we need to consider the potential off-target DNA cleavage. These alterations may be observed in the case of other sequences in the genome, which would show a very high degree of homology to the modified locus (Hsu 2013). In order to reduce the off-target activity the most unique sequences should be selected when designing sgRNA, while adequate Cas9 and sgRNA concentrations need to be applied during transfection (an excessively high concentration may increase off-target activity) and the loci in the genome with a high homology to the modified locus needs to be verified in terms of the occurrence of undesirable cleavages e.g. by sequencing of that region. In order to limit the possibility of cleavage of undesirable sequences a modified version of Cas9 nuclease may be used, containing a mutation eliminating the activity of one of the nuclease domains (D10A within the RuvC domain or H840A in the HNH domain), i.e. resulting in a situation when the enzyme cleaves only one DNA strand, the so-called Cas9 Nickase protein. In this case to inactivate a selected gene two sgRNAs may be used, targeting adjacent loci in both strands. Each sgRNA will induce bond hydrolysis within only one DNA strand. The application of two sgRNAs will lead to the formation of a break in both DNA strands within a small distance from each other. Such breaks are repaired in the process of non-homologous end joining, leading to indel mutations. Such a method guarantees a markedly higher specificity, since the probability of two sequences recognised by different sgRNAs, separated by a very small distance within the genome, is slight and a vast majority of one-strand breaks at off-target sites are repaired by base cleavage.

### **3. Delivery methods for genome editing**

Many methods have been developed to deliver programmed nucleases inside the cell. Constructs may be introduced to plants using agrotransformation with plasmid or viral vectors. Nucleases may also be delivered in the form of mRNA, which eliminates the problem of integration with the genome and reduces expression time. However, if the aim is to generate genetically modified animals, as a rule nucleases in the form of mRNA are inserted *in vitro* into a fertilized egg cell using a micromanipulator. Typically the RNA format is used instead of a protein-coding plasmid, as modification efficiency of a given locus is greater. In turn, the application of the CRISPR/Cas9 system delivered to cells via viral vectors has made it possible to introduce mutations in cells of adult animals *in vivo*. In contrast, in order to modify stem cells *in vitro*, programmed nucleases may be delivered to cells by electroporation. To utilize the repair mechanism through homologous recombination, at the same time the donor template needs to be introduced to the cell. Such a template has to be flanked with sequences homologous to the targeted locus. Typically the donor template is composed of plasmid DNA (homology arms are usually 500-1000 base pairs each) or short fragments of single stranded DNA (ssDNA; its length is usually 40-100 nucleotides). Site-specific nucleases may also be delivered directly as proteins. However, their production, isolation and purification in sufficient amounts is extremely difficult (Yin et al. 2017).

### **4. Application of genome editing technology**

The use of site-specific nucleases provides practically an almost unlimited potential for genome editing and facilitates more efficient, cheaper and more rapid generation of genetically modified plants and animals in comparison to conventional methods. These new technologies make it possible to create animal models of genetic diseases. Mutations introduced to the animal genome may recreate mutations found in patients suffering from specific diseases. Among other things,

effective insertion of foreign DNA into a selected locus in the genome makes it possible to replace the mutated gene with its correct version. In the future this phenomenon might be used in treatment of single-gene disorders, such as e.g. Duchenne muscular dystrophy (Long et al. 2014). Mutations within the dystrophin coding gene, causing Duchenne's muscular dystrophy, are most frequently large deletions or duplications of one or several exons, as well as point mutations leading to a frameshift change and the appearance of a premature stop codon. The application of site-specific nucleases makes it possible to repair a mutated gene and restore the active dystrophin form thanks to the removal of a gene fragment, repair through homologous recombination or the introduction of an indel change within the stop codon in the NHEJ process. Moreover, ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9 technologies may be used to inactivate the CCR5 gene in human CD4+ cells. CCR5 is the target of many HIV therapies, since this receptor is used by this virus to infect T lymphocytes (Ye et al. 2014). Site-specific nucleases may also be used to produce genetically modified pigs for xenotransplantation purposes (Estrada et al. 2015, Fischer et al. 2016). Thanks to advances in genetic engineering it is now possible to modify the genome of pigs to be used as donors of cells, tissues and organs for human recipients in order to inhibit process leading to xenotransplant rejection. Thanks to the development of a highly efficient CRISPR/Cas9 technology 3 modifications could be introduced to the pig genome, simultaneously resulting in the inactivation of genes responsible for the formation of xenoreactive antigens: Gal $\alpha$ (1,3)Gal (Galactose-alpha-1,3-galactose), Neu5Gc (N-glycolylneuraminic acid) and a glycan formed as a result of the enzymatic activity of  $\beta$ 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase ( $\beta$ 4GalNT2) (Estrada et al. 2015). What is more, the CRISPR/Cas9 technology was applied to produce multitransgenic pigs with the expression of HO-1 (heme oxygenase 1), A20 (tumor necrosis factor alpha-induced protein 3), CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay-accelerating factor), and CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis) in the human. A breakthrough aspect of this study is connected with the fact that all the five transgenes were introduced in one genomic locus, thanks to which the introduced genes will be inherited without any segregation (Fischer et al. 2016). The application of ZFN, TALEN and the CRISPR/Cas9 technology may also be highly useful in genome modification of farm animals, aiming at more rapid body weight gains, enhanced animal productivity, improved quality of animal origin products, increased disease resistance, or to obtain transgenic animals producing recombinant proteins for pharmaceutical purposes (Petersen and Niemann 2015, Petersen 2017). Studies are also being conducted on the modification of insects to prevent them from spreading diseases, e.g. mosquitos transmitting malaria *Plasmodium*. For this purpose the CRISPR/Cas9-based gene drive system may be used, promoting inheritance of specific genes to increase their incidence rate in the population. In this technique the introduced plasmid contains Cas9, gRNA and the transgene, surrounded by the flanking sequences. The Cas9 protein cleaves the sequence at a site targeted by gRNA. Cleavage activates the HDR repair system in the cell and the construct is inserted in the DNA strand. Next as a result of crossing the organism expressing the turned on transgene with a wild-type organism, the gene drive system recognizes another version of the gene in the wild-type organism, cleaves it and replaces with the construct it carries. In this way the CRISPR/Cas9 complex introduced to the chromosome edits simultaneously both copies of the gene in the auto-catalyzed process. This phenomenon is referred to as the mutagenic chain reaction (MCR). In sexually reproducing species most genes are presented in two copies. Each of the copies has a 50% chance of being transmitted to progeny. The gene drive system circumvents this principle, considerably increasing the probability that a given allele will be transmitted to progeny (Gantz and Bier 2015). This system might be applicable in population suppression thanks to the incorporation of a lethal gene in the mosquito genome. Moreover, incorporating into the mosquito genome a transgene conferring resistance to the attacking pathogen would make it possible to obtain a population of mosquitos producing antibodies or anti-malaria compounds in their organisms, thanks to which they would no longer be capable of transmitting malaria. Additionally, the CRISPR/Cas9 technology may be used to visualize specific sites in the genome of live cells. Thanks to the application of catalytically inactive Cas9 nuclease (dCas9) bound with the fluorescent protein and interacting with specifically designed sgRNA, specific loci in the genome of live cells may be visualized (Chen et al. 2013). This method may prove to be very useful in studies on the cell nucleus architecture or the degree of chromatin concentration in a given area of the chromosome. Moreover, the catalytically inactive

version of Cas9, at a simultaneous expression of sgRNA complementary to the template DNA strand, may be used to inhibit transcription of selected genes or as a transcription activator (Qi et al. 2013). The application of dCas9 as an activator of transcription requires the attachment of a transactivating domain, e.g. VP16, or an activating domain from the p65 protein. In turn, to enhance efficiency of transcription repression a repressor domain, e.g. KRAB, is attached to the dCas9 protein. Silencing of gene expression using the CRISPR system was termed CRISPRi (CRISPR interference). CRISPRi acts at the DNA level, thanks to which considerable silencing of expression may be obtained for the gene of interest by targeting the gene promoter area.

## 5. Summary

Introduction of novel genetic engineering tools such as site-specific nucleases has revolutionized science. New methods have considerably enhanced current potential for modification of both plant and animal genomes, making it possible to introduce targeted, site-specific changes in the genetic material, e.g. point mutations, insertions or deletions of entire DNA segments. The ZFN, TALEN and CRISPR/Cas9 technologies are applied, among other things, to create animal and cell models of diseases, in xenotransplantation, gene therapy or biotechnology in plant and animal production.

## 6. Acknowledgements

This work was supported by The National Centre for Research and Development (Grant No. INNOMED/I/17/NCBR/ 2014) in the framework of the “INNOMED” programme titled “Development of an innovative technology using transgenic porcine tissues for biomedical purposes”. Acronym: “MEDPIG”.

## 7. References:

- Chandrasegaran S and Carroll D (2016) Origins of programmable nucleases for genome engineering. *J Mol Biol* 428: 963–989.
- Chen B, Gilbert LA, Cimini BA et al. (2013) Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* 155: 1479–1491.
- Cong L, Ran FA, Cox D et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819–823.
- Estrada JL, Martens G, Li P, et al. (2015) Evaluation of human and non-human primate antibody binding to pig cells lacking GGTA1/CMAH/beta4GalNT2 genes. *Xenotransplantation* 22: 194–202.
- Fischer K, Kraner-Scheiber S, Petersen B, et al. (2016) Efficient production of multi-modified pigs for xenotransplantation by ‘combineering’, gene stacking and gene editing. *Scientific Reports* 6: 29081.
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF III (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 31: 397–405.
- Gantz VM and Bier E (2015) The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science* 348(6233): 442–444.
- Hryhorowicz M, Lipiński D, Zeyland J et al. (2017) CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Arch Immunol Ther Exp* 65(3): 233–240.
- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA et al. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol* 31: 827–832.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I et al. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816–821.
- Kakarougkas A, Jeggo PA (2014) DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. *Br J Radiol* 87(1035): 20130685.
- Long C, McAnally JR, Shelton JM et al. (2014) Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science* 345: 1184–1188.

- Nemudryi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, et al. (2014) TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae* 6: 19–40.
- Petersen B, Niemann H (2015) Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. *Transgen Res* 24: 381–396.
- Petersen B (2017) Basics of genome editing technology and its application in livestock species. *Reprod Domest Anim* 52 Suppl 3: 4-13.
- Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152: 1173–1183.
- Rudin N, Sugarman E, Haber JE (1989) Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 519-534.
- Sega P, Linkiewicz A (2014) Wykorzystanie miejscowo-specyficznych nukleaz do modyfikacji genomów roślinnych. *Postępy biologii komórki* 41(4): 701–720.
- Ye L, Wang J, Beyer AI et al. (2014) Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Delta32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 9591–9596.
- Yin H, Kauffman KJ, Anderson DG (2017) Delivery technologies for genome editing. *Nat Rev Drug Discov* 16: 387–399.

## **14. Transgeneza – rozwój metod wykorzystywanych w uzyskiwaniu zwierząt użytecznych w ksenotransplantacjach**

Transgenesis - development of methods used to obtain animals for xenotransplantation

Natalia Mazurkiewicz, Agnieszka Nowak-Terpiłowska, Magdalena Hryhorowicz, Joanna Zeyland, Daniel Lipiński

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Opiekun naukowy: prof. dr hab. Ryszard Słomski

Natalia Mazurkiewicz: nmmazurkiewicz@gmail.com

Słowa Kluczowe: modyfikacje genetyczne, transplantacje, duże zwierzęta modelowe

### **Streszczenie**

Po dokonaniu pierwszej udanej transgenezy nastąpił dynamiczny rozwój metod otrzymywania zwierząt modyfikowanych. Pierwsze z nich wymagały dużego nakładu pracy i czasu, a uzyskane osobniki mogły się charakteryzować między innymi przypadkowo wbudowanymi w genom konstrukcjami modyfikującymi. Z czasem następowało doskonalenie metod modyfikacji pod kątem ukierunkowanych zmian w genomie. Obecnie najczęściej stosowanym systemem wprowadzania zmian w genomie jest CRISPR/Cas9. Metoda ta wykorzystuje mechanizm występujący naturalnie w systemach bakteryjnych, w których pełni funkcję obronną przed m.in. wirusowym DNA. Rozwój tej metody w charakterze narzędzia inżynierii genetycznej przyczynił się do rewitalizacji badań związanych z wykorzystaniem zwierząt transgenicznych jako źródła komórek, tkanek i narządów w ksenotransplantacjach. Zagadnienia te odpowiadają ważnemu społecznie problemowi dotyczącemu niedoboru organów do przeszczepów.

### **1. Wstęp**

Rozwój transgenezy rozpoczął się w XX wieku. Zwierzęta transgeniczne były nadzieją na rozwój wiedzy dotyczącej ekspresji genów oraz genetycznych podstaw rozwoju osobniczego. Ponadto duże zainteresowanie ze strony przemysłu, ze względu na możliwość otrzymania zwierząt o ulepszonych cechach użytkowych, przyspieszyło rozwój metod modyfikacji genetycznych.

Pierwszą udaną transgenezę wykonano w roku 1982. Grupa badaczy ze Stanów Zjednoczonych (uzyskała myszy z wprowadzonym genem kodującym hormon wzrostu pochodzącym od szczura, ulegającym ekspresji pod kontrolą promotora szczurzej metalotioneiny I (Mt-rGH z ang. Metallothionein-rat Growth Hormone). Aby otrzymać transgeniczne myszy wykonano mikroiniekcję egzogenego DNA do zygot mysich. Efektem tej modyfikacji były osobniki charakteryzujące się większymi rozmiarami w porównaniu do średnich wielkości innych przedstawicieli tego gatunku. Dzięki temu uzyskano pierwszy żywy model choroby – gigantyzmu, co pozwoliło na analizę jej przebiegu oraz otrzymanie najbardziej efektywnego leku i dostosowanie jego dawki (Palmiter i in. 1982).

W kontekście ksenotransplantacji w Polsce pierwszą udaną transgenezę świń (*Sus scrofa*) przeprowadzono w Instytucie Zootechniki w Balicach koło Krakowa. W jej wyniku we wrześniu 2003 roku otrzymano knura, któremu nadano nazwę TG 1154. Ów osobnik był założycielem pierwszej transgenicznej linii świń w Polsce – już w maju 2004 roku liczyła ona 100 potomków. Przeprowadzona modyfikacja polegała na wprowadzeniu do genomu konstrukcji zawierającej gen kodujący  $\alpha$ -1,2-fukozylotransferazę człowieka. Enzym powstały w wyniku ekspresji wprowadzonej konstrukcji konkuruje z  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazą o substrat N-acetylolaktozaminę, biorącą udział w syntezie epitopu Gal na powierzchni komórek świni. Modyfikacja miała na celu ograniczenie ilości owego antygeny Gal, a w efekcie zmniejszenie reakcji immunologicznej organizmu ludzkiego na ewentualny przeszczep ksenogeniczny. U knura TG 1154 wykazano ekspresję 1,2-fukozylotransferazy człowieka (Jura i in. 2006).

## 2. Opis zagadnienia

Pojęcie transgeneza odnosi się zarówno do modyfikacji zwierząt, jak i roślin. Pod tym pojęciem rozumie się wszelkie techniki biologii molekularnej prowadzące do otrzymania organizmów zmodyfikowanych genetycznie inaczej zwanych transformantami. Natomiast transgenezę zwierząt definiujemy jako zmianę dokonaną poprzez wprowadzenie do genomu biorcy egzogenego DNA pochodzącego z tego samego lub innego gatunku. Wprowadzany gen nazywany jest transgenem. Obecnie należy poszerzyć tę definicję o modyfikacje polegające nie tylko na wprowadzaniu dodatkowego genu, ale także zastępowaniu oraz usuwaniu genów w genomie modyfikowanego osobnika. Podsumowując, transgenezą nazywamy wszelkie modyfikacje genetyczne prowadzące do zmiany w genomie organizmu (Cooper, Eksler i Tector 2015).

Zainteresowanie transgenezą zwierząt związane jest nie tylko z badaniami podstawowymi dotyczącymi funkcji genów oraz ich ekspresji, ale również możliwą poprawą jakości oraz ilości produktów pochodzenia zwierzęcego dla celów przemysłu spożywczego, polepszeniem stanu zdrowia samych zwierząt, czy ksenotransplantacją. Kolejnym kierunkiem zastosowania transgenezy jest wykorzystanie zwierząt w produkcji biofarmaceutyków (Smorag, Słomski i Jura 2009).

Transgeniczne zwierzęta odgrywają coraz większą rolę w farmacji. Biofarmaceutyki to substancje lecznicze używane w terapiach różnych chorób, wytwarzane metodami biologicznymi oraz biotechnologicznymi. Początkowo produkowano je w systemach bakteryjnych, drożdżowych oraz roślinnych. Jednak dopiero zastosowanie zwierząt transgenicznych umożliwiło powstanie wielu w pełni funkcjonalnych złożonych substancji, takich jak białka, przez co ich wdrożenie do leczenia człowieka stało się możliwe. Przed wykorzystaniem zwierząt do ich wytwarzania próbowano zastosować w tym celu hodowle komórek zwierzęcych w warunkach *in vitro*. Trudności w prowadzeniu takich hodowli oraz jej koszty sprawiły, że produkcja biofarmaceutyków w mleku, moczu czy krwi zwierząt transgenicznych stała się lepszą alternatywą. Największą wydajnością cechuje się produkcja substancji leczniczych uzyskiwanych z mleka zwierząt. Mimo tego, że najbardziej atrakcyjnym zwierzęciem do uzyskania dużej ilości farmaceutyków w mleku jest bydło, to utrudnienia związane z kosztami oraz czasem koniecznym do przeprowadzania udanej transgenezy sprawiają, że większym zainteresowaniem cieszą się króliki, świnię oraz owce (Bertolini i in. 2016). W 1994 roku opublikowano badania dotyczące otrzymania transgenicznego buhaja z jedną kopią erytropoetyny człowieka ulegającej ekspresji pod kontrolą promotora  $\beta$ -kazeiny bydlęcej (Hyttinen i in. 1994). Kolejną uzyskaną modyfikacją, tym razem u świni, było wprowadzenie konstrukcji genowej zawierającej białko C człowieka umieszczone w miejscu KpnI eksonu 1 genu kwaśnego białka serwatki WAP (z ang. whey acidic protein) myszy. Dzięki tej modyfikacji uzyskano osobniki wydzielające mleko zawierające 1g tego białka w litrze. Białko C pełni u człowieka ważną rolę w krzepnięciu krwi, przez co wydaje się być atrakcyjnym lekiem (Velander i in. 1992). Pierwszym komercyjnie dostępnym lekiem wytwarzanym przez transgeniczne zwierzęta i zatwierdzonym przez Europejską Agencję Leków jest rekombinowane białko – antytrombina człowieka – produkowana przez kozy w ich mleku. Lek o nazwie ATryn® został wprowadzony na rynek w 2007 roku (Echelard, Meade i Ziomek 2008).

Ważnym kierunkiem wykorzystania transgenezy jest zarówno poprawa zdrowia zwierząt oraz ulepszenie ich cech użytkowych. Prowadzono doświadczenia mające na celu zmniejszenie ilość tłuszczu w mięsie genetycznie modyfikowanych świń. W 1994 roku powstała praca przedstawiająca wady i zalety mięsa świń transgenicznych w porównaniu do świń niemodyfikowanych na różnych etapach rozwoju zwierząt. Osobniki te uzyskane zostały poprzez wprowadzenie bydlęcego genu hormonu wzrostu. Wyniki badań wykazały na każdym etapie różny poziom zmniejszonej ilości tłuszczu u modyfikowanych świń w porównaniu do osobników nietransgenicznych. Wykazano również korelację związaną ze zwiększaniem zawartości wody gromadzonej w tkance mięśniowej transgenicznych osobników wraz ze zmniejszaniem się ilości tłuszczu. Było to tak dużą wadą, że modyfikacja ta nie została wykorzystana w celach produkcyjnych (Wheeler 2013).

Zwierzęta transgeniczne pozyskuje się również w celach biomedycznych. Osobniki modyfikowane można wykorzystać do badań nad chorobami człowieka. W 1997 roku opublikowano pracę przedstawiającą model choroby – barwnikowego zwyrodnienia siatkówki oka – uzyskany

dzięki transgenezie świni. Wybór tego zwierzęcia wynikał z cytologicznego podobieństwa siatkówki transgenicznych świń z siatkówką człowieka, zwyrodnioną przez chorobę. Dzięki wprowadzeniu konstrukcji zawierającej zmutowany gen kodujący rodopsynę powstała możliwość zbadania najwcześniejszych etapów degeneracji fotoreceptorów (Petters i in. 1997).

Innym celem biomedycznym jest zastosowanie komórek, tkanek czy narządów świń transgenicznych w ksenotransplantacjach. Występowanie w surowicy człowieka ksenoreaktywnych przeciwciał oddziałujących z antygenem Gal, obecnym na powierzchni komórek na glikolipidach i glikoproteinach membranowych, jest istotną przeszkodą przy przeszczepach organów i tkanek pochodzących od świń niepoddanych modyfikacjom. Jedną z przykładowych zmian genetycznych prowadzących do uzyskania transgenicznych osobników, które z powodzeniem mogłyby zostać wykorzystane w medycynie regeneracyjnej jest wyłączenie genu kodującego enzym  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazę (*GGTA1* gen kodujący glikoproteinę –  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazę świni z ang. alpha-galactosyltransferase 1) odpowiedzialną za syntezę epitopu Gal. W 2002 roku po raz pierwszy uzyskano transgeniczne świnię posiadające wyłączony gen *GGTA1* w jednym allelu. W tym celu użyto specjalnych wektorów umożliwiających wprowadzenie genu zmienionego, który po rekombinacji homologicznej nie ulegał kompletnej ekspresji. Skutkowało to niepowstawaniem funkcjonalnego enzymu. Jednak w związku z tym, że modyfikacja ta została uzyskana w układzie heterozygotycznym, jeden niezmieniony allel ulegał ekspresji, przez co na powierzchni komórek identyfikowano obecność epitopu Gal. Rok później otrzymano homozygotyczne zwierzęta z wyłączonym (ang. *knock-out*) genem *GGTA1* (Phelps i in. 2003).

Uzyskanie zwierząt transgenicznych przyczyniło się do rozwoju różnych dziedzin nauki, w tym medycyny, rolnictwa oraz biotechnologii. Większość zastosowań jest jednak w trakcie szczegółowych badań, a w przypadku wykorzystania modyfikowanych świń w medycynie niezbędne stają się dodatkowo badania kliniczne.

### 3. Przegląd literatury

Istnieje wiele metod uzyskiwania zwierząt transgenicznych. Udoskonalanie stosowanych technik służy otrzymaniu jak najwyższej wydajności metody oraz zmniejszeniu nakładów finansowych na wykonywanie związanych z nimi procedur. Najstarszą metodą wykorzystywaną w celu uzyskania zwierząt transgenicznych jest mikroiniekcja. Ta dobrze rozwinięta technologia polega na wstrzyknięciu kilku tysięcy kopii danego genu/konstrukcji genowej/wektora (mieszczących się w granicy 2-5 pl roztworu DNA) do przedjądra męskiego. Ze względu na trudność w rozpoznaniu przedjądra męskiego, często mikroiniekcji dokonuje się po prostu do jednego przedjądra. Po mikroiniekcji następuje syngamia oraz towarzysząca temu rekombinacja matczynego i ojcowskiego genomu. Mikroiniekcja DNA wymaga użycia mikroskopu odwróconego, pod którym wykonywana jest ona z wykorzystaniem mikromanipulatorów. Procedura ta jest z powodzeniem stosowana do produkcji zwierząt transgenicznych od ponad 35 lat. Wydajność mikroiniekcji DNA jest uzależniona między innymi od czystości roztworu DNA, jego stężenia, formy wektora (liniowa/kolista), zakończenia liniowych form konstrukcji – tępe/lepkie końce DNA, długości wprowadzanej konstrukcji (wraz ze wzrostem długości maleje wydajność integracji), umiejętności przeprowadzającego procedurę czy stadium w jakim znajduje się zarodek. Z powodu niskiej wydajności procedury (wynoszącej u myszy 10%, świni 2-3%, królika 4%, poniżej 1% u bydła) badacze wprowadzają modyfikacje mające na celu zwiększenie ilości udanych mikroiniekcji i dalej transgenezy. Jedną z takich zmian była równoczesna iniekcja transgeny do obu przedjądrzy. Zaobserwowano wówczas zwiększoną wydajność integracji transgeny jednak przy wysokiej inwazyjności procesu skutkującej dużą śmiertelnością zarodków. Kolejne próby przeprowadzano stosując mikroiniekcję DNA bezpośrednio do cytoplazmy zarodka. Zlikwidowano w ten sposób problem wysokiej inwazyjności iniekcji, natomiast powstał problem z integracją egzogennej DNA i drastycznym spadkiem wydajności procedury. Kolejną modyfikacją mikroiniekcji DNA było dostarczenie transgeny do jąder komórkowych zarodka dwukomórkowego. Miała ona na celu zwiększenie przeżywalności zarodków, jednak ze względu na większe prawdopodobieństwo uzyskania zwierząt mozaikowych niż transgenicznych, nie jest powszechnie stosowana w transgenezie (Sumiyama, Kawakami i Yagita 2010).



Drugą metodą używaną w uzyskiwaniu zwierząt transgenicznych jest wykorzystanie plemników jako nośników egzogenego DNA. Zdolność plemników do wiązania egzogenego DNA została po raz pierwszy zaobserwowana w 1971 roku. Egzogenny DNA może być wprowadzany poprzez:

- inkubację pozbawionych osocza plemników z DNA w odpowiedniej temperaturze,
- elektroporację,
- lipofekcję,
- użycie enzymów restrykcyjnych lub przeciwciał monoklonalnych.

Tak uzyskane plemniki wykorzystuje się do zapłodnienia *in vitro* lub inseminacji. Istnieje również metoda, która umożliwia powstanie transgenicznych zwierząt poprzez naturalne krycie zwierząt. Dzieje się to dzięki bezpośredniemu wstrzyknięciu roztworu egzogenego DNA do kanalików nasiennych, z których plemniki w sposób naturalny go pobierają lub przenoszą na swojej powierzchni. Metoda z użyciem plemników budzi jednak wiele pytań, gdyż do tej pory nie udało się uzyskać powtarzalnych wyników, które potwierdziłyby jej skuteczność (Jurkiewicz 2006).

Kolejną metodą, dzięki której można otrzymać transgeniczne zwierzęta, jest wykorzystanie transformowanych komórek do klonowania somatycznego (SCNT z ang. somatic cell nuclear transfer). Zainteresowanie tym rozwiązaniem wzrasta od 1996 roku, kiedy to po raz pierwszy sklonowano zwierzę – owcę Dolly. Metoda ta umożliwia zastosowanie szerokiej puli dostępnych technik związanych z modyfikacją genetyczną komórek, których jądra komórkowe użyte są później do klonowania. Dobór metody dostarczenia egzogenego DNA zależy od jego długości, używanych komórek oraz wydajności. Po identyfikacji komórek z odpowiednią modyfikacją należy doprowadzić je do fazy spoczynku cyklu komórkowego – G0. Uzyskuje się to przez tzw. „głodzenie”, czyli hodowlę w medium komórkowym z bardzo niską zawartością surowicy. Aby ominąć proces „głodzenia” komórek w 2002 roku sklonowano po raz pierwszy królika z wykorzystaniem jąder komórkowych z komórek pęcherzykowych wzgórka jajonośnego w fazie cyklu komórkowego G0/G1. W tej metodzie jądra komórkowe zmodyfikowanych komórek przenoszone są do enukleowanych (pozbawionych jądra komórkowego) oocytów. Jakość oocytów oraz ich wiek wpływa na proces klonowania. Cała metoda otrzymywania transgenicznych zwierząt poprzez wykorzystanie transformowanych komórek do klonowania somatycznego ma wiele zalet, ale jej główną wadą jest duża umieralność płodów wynikająca przede wszystkim z występowania wad genetycznych głównie o podłożu epigenetycznym (Campbell 2002).

Kolejną metodą jest wykorzystanie komórek macierzystych w celu uzyskania zwierząt transgenicznych. Technika ta polega na modyfikacji komórek macierzystych *in vitro*, a następnie przenoszeniu komórek zmienionych genetycznie do będących w stadium blastocysty zarodków. W 1992 roku uzyskano transgeniczne myszy poprzez transfer zmodyfikowanych genetycznie embrionalnych komórek macierzystych (ESCs z ang. embryonic stem cells) do blastocysty. W ten sposób otrzymano zwierzęta heterozygotyczne pod względem interesującej modyfikacji, a poprzez krzyżowanie osobników siostrzanych – homozygoty. Transgeniczne myszy uzyskano po to, aby zbadać rolę białka kodowanego przez gen *apoE* w transporcie lipoprotein we krwi. Otrzymany szczep myszy był podatny na miażdżycę i stanowił żywy model tej choroby. Modyfikację embrionalnych komórek macierzystych związaną z powstawaniem niefunkcjonalnego białka – apolipoproteiny E - uzyskano poprzez rekombinację homologiczną zmienionego poprzez insercje i delecje genu *apoE*. Po tym procesie dokonywano selekcji komórek ze zmianą. Technika wykorzystująca komórki macierzyste w transgenezie zwierząt umożliwia uzyskanie modyfikacji genów typu knock-in oraz warunkowo, indukcyjnie typu knock-out (Brinster 2002).

Inną metodą uzyskiwania zwierząt transgenicznych jest modyfikacja za pomocą wektorów lentiwirusowych. Transgeneza wirusowa jest oparta na dostarczaniu egzogenego DNA do zarodków za pomocą rekombinowanych wirusów. Im wcześniej nastąpi moment infekcji, tym więcej komórek rozwijającego się zarodka będzie podlegało modyfikacjom prowadzącym do uzyskania transgenicznych zwierząt. Po raz pierwszy metodę tą zastosowano w celu uzyskania transgenicznych świni w 2003 roku. Wektory lentiwirusowe przenoszące gen kodujący zielone białko fluorescencyjne (GFP z ang. green fluorescent protein) i ulegających ekspresji pod kontrolą promotora kinazy fosfoglicerynianowej (LV-PGK z ang. phosphoglycerate kinase) dostarczane były do zarodków

świni. Spośród 46 prosiąt poddawanych oddziaływaniu lentiwirusów, 32 (70%) były nosicielami egzogenego DNA, z czego u 94% (30 osobników) stwierdzono jego ekspresję (Pfeifer 2004).

Kolejną metodą otrzymywania zwierząt modyfikowanych jest transgeneza przy użyciu nukleaz z motywem palca cynkowego. Podejście to umożliwia precyzyjną modyfikację genomu polegającą na specyficznym wiązaniu się nukleaz z zaprojektowanym motywem palców cynkowych, który łączy się z docelową sekwencją DNA. Domena nukleazowa FokI hydrolizuje obie nici kwasu nukleinowego. Umożliwia w ten sposób zajęcie jednej z trzech możliwych metod naprawy powstałego pęknięcia. Są to:

- naprawa homologiczna (specyficzne delecje, insercje, mutacje),
- niehomologiczna naprawa poprzez połączenie końców nici DNA (przypadkowe delecje, insercje),
- niehomologiczna integracja fragmentu DNA i połączenie nici kwasu nukleinowego (ukierunkowana integracja) (Petolino i in. 2010).

Modyfikacje z zastosowaniem nukleaz z motywem palca cynkowego przeprowadza się w komórkach hodowanych w warunkach *in vitro*, a następnie po wyborze odpowiednich komórek przenosi się ich jądra do enukleowanego oocytu i całość implantuje biornicy. Dzięki zastosowaniu tej metody w 2011 roku opublikowano pracę przedstawiającą otrzymanie homozygotycznego knock-out genu *GGTA1* świni kodującego  $\alpha$ -1,3-galaktozylotransferazę odpowiedzialną za syntezę specyficznego antygeny powierzchniowego Gal. Takie zwierzęta w teorii można by wykorzystywać w przeszczepach międzygatunkowych. Uzyskano sześć płodów zwierząt z całkowitym brakiem epitopu Gal na powierzchni komórek. Osobniki te fenotypowo nie różniły się od niemodyfikowanej populacji świń (*Sus scrofa*), co pokazuje, że nukleazy z motywem palca cynkowego nie wpływają negatywnie na proces klonowania somatycznego. Metoda ta daje najwięcej możliwości w modyfikacji zwierząt, jednak wymaga dokładnego poznania sekwencji genu docelowego oraz fragmentów DNA sąsiadujących z nim, a także jest bardzo kosztowna, co stanowi barierę w jej powszechnym zastosowaniu (Hauschild i in. 2011).

Odkrycie w 2012 roku przez kilka zespołów badawczych jednocześnie nowego zastosowania bakteryjnego system CRISPR/Cas9 umożliwiło ogromny rozwój inżynierii genetycznej w kontekście modyfikacji genomów. Metoda ta została również uznana za najlepszą do zastosowania terapii genowej (Mali i in. 2013). System stosowany w inżynierii genetycznej składa się z białka Cas9 z *S. pyogenes*, krótkiego oligonukleotydu crRNA (gRNA) komplementarnego do miejsca docelowej modyfikacji. Ważnym elementem przy projektowaniu gRNA jest znalezienie sekwencji PAM (z ang. protospacer adjacent motif), która to jest elementem umożliwiającym hydrolizę sekwencji docelowej. System CRISPR/Cas9 umożliwia przecięcie specyficjnej sekwencji i jej naprawę według dwóch schematów: niehomologiczną naprawę poprzez połączenie końców nici DNA (z ang. non-homologous end joining, NHEJ) powodującą przypadkowe delecje, insercje oraz naprawę homologiczną (z ang. homology-directed repair) umożliwiającą wprowadzenie dodatkowego materiału genetycznego i jego wbudowanie w miejsce przecięcia na zasadzie rekombinacji homologicznej. Obecnie stosuje się kilka modyfikacji tego systemu, które umożliwiają coraz szersze zastosowanie go w biotechnologii. Edytowanie genomu za pomocą nukleaz Cas9 i technologii CRISPR umożliwiło otrzymanie świń transgenicznych wykazujące kilka modyfikacji. Przykładem może być uzyskanie w 2015 roku świń z wyłączonym genem *GGTA1*,  $\beta$ 4GalNT2 kodującym transferazę  $\beta$ 4GalNT2 (z ang.  $\beta$ 1,4-N-acetylogalactosaminylotransferase 2) oraz *CMAH* kodującym hydroksylazę (z ang. cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase) (Estrada i in. 2015).

#### **4. Podsumowanie**

Rozwój technologii inżynierii genetycznej umożliwiających otrzymywanie zwierząt transgenicznych przyczynił się do intensyfikacji badań w kierunku wykorzystania ich wyników. Szczególną uwagę naukowców skupiają możliwe zastosowania biomedyczne produktów powstałych w wyniku transgenezy. W dobie precyzyjnych systemów modyfikujących genom wiele z nich ma szansę na wprowadzenie do praktyki klinicznej.

Zastosowanie zwierząt transgenicznych w celach ksenotransplantacyjnych staje się coraz bardziej realną alternatywą dla standardowych przeszczepów allogenicznych. Co więcej stanowić może potencjalne rozwiązanie problemu niedoboru organów do transplantacji. Obecnie największym wyzwaniem stało się uzyskanie zwierząt z odpowiednimi wieloma modyfikacjami – osobników multitransgenicznych. Wiele badań przechodzi już etap przedkliniczny z wykorzystaniem małych naczelnych jako organizmów modelowych. Dzięki rozwojowi metod transgenezy możliwe stało się rozpoczęcie badań klinicznych ksenotransplantacji, a ich powodzenie może stanowić przełom w nowoczesnej medycynie.

*Prezentowana praca uzyskała wsparcie finansowe z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (umowa nr INNOMED/I/17/NCBR/2014) ze środków Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.*

## **5. Literatura:**

- Bertolini LR, Meade H, Lazzarotto CR, et al. (2016) The Transgenic Animal Platform for Biopharmaceutical Production. *Transgenic Research* 25 (3): 329–43.
- Brinster RL (2002) Germline Stem Cell Transplantation and Transgenesis. *Science* 296: 2174–2176.
- Campbell KHS (2002) A Background to Nuclear Transfer and Its Applications in Agriculture and Human Therapeutic Medicine. *Journal of Anatomy* 200 (3): 267–75.
- Cooper DKC, Eksler B, Tector JA (2015) A Brief History of Clinical Xenotransplantation. *International Journal of Surgery* 23: 205–210.
- Echelard Y, Meade HM, Ziomek CA (2008) The First Biopharmaceutical from Transgenic Animals: ATryn®. *Modern Biopharmaceuticals* 1:995–1020.
- Estrada JL, Martens G, Li P, et al. (2015) Evaluation of Human and Non-Human Primate Antibody Binding to Pig Cells Lacking GGTA1/CMAH/β4GalNT2 Genes. *Xenotransplantation* 22 (3): 194–202.
- Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, et al. (2011) Efficient Generation of a Biallelic Knockout in Pigs Using Zinc-Finger Nucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (36): 15010–15010.
- Hyttinen JM, Peura T, Tolvanen M, et al. (1994) Generation of Transgenic Dairy Cattle from Transgene-Analyzed and Sexed Embryos Produced in Vitro. *Biotechnology* 12 (6): 606–608.
- Jura J, Słomski R, Gajda B, et al. (2006) Uzyskiwanie Świń Wykorzystywanych W Ksenotransplantacji. *Biotechnologia* 1 (72): 151–58.
- Jurkiewicz J (2006) Plemniki Jako Wektory DNA W Uzyskiwaniu Zwierząt Transgenicznych. *Biotechnologia* 1 (72): 29–43.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. (2013) RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* 339: 823–826.
- Palmiter R, Brinster RL, Hammer R, et al. (1982) Dramatic Growth of Mice That Develop from Eggs Microinjected with Metallothionein-Growth Hormone Fusion Genes. *Nature* 300: 611–615.
- Petolino JF, Worden A, Curlee K, et al. (2010) Zinc Finger Nuclease-Mediated Transgene Deletion. *Plant Molecular Biology* 73 (6): 617–628.
- Petters RMC, Wells KD, Collins EB, et al. (1997) Genetically Engineered Large Animal Model for Studying Cone Photoreceptor Survival and Degeneration in Retinitis Pigmentosa. *Nature Biotechnology* 15 (10): 965–970.
- Pfeifer A (2004) Lentiviral Transgenesis. *Transgenic Research* 13: 513–522.
- Phelps CJ, Koike C, Vaught TD, et al. (2003) Production of Alpha-1,3-Galactosyltransferase-Deficient Pigs. *Science* 299 (5605): 411–414.
- Smorag Z, Słomski R, Jura J (2009) Transgeniczne Zwierzęta W Hodowli, Farmacji I Biomedycynie. *Postępy Nauk Rolniczych* 61:3–4.
- Sumiyama K, Kawakami K, Yagita K (2010) A Simple and Highly Efficient Transgenesis Method in Mice with the Tol2 Transposon System and Cytoplasmic Microinjection. *Genomics* 95 (5):306–311.

Velander WH, Johnsonf JL, Page RL, et al. (1992) High-Level Expression of a Heterologus Protein in the Milk of Transgenic Swine Using the cDNA Encoding Human Protein C. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89: 12003–12007.

Wheeler MB (2013) Transgenic Animals in Agriculture. *Nature Education Knowledge* 4 (11): 1.

## **15. Białko błonowe CD47 człowieka: właściwości i wykorzystanie w transgeniezie świń na cele ksenotransplantacyjne**

Human CD47 membrane protein: properties and use in pig transgenesis for xenotransplantation purposes

Natalia Mazurkiewicz, Agnieszka Nowak-Terpiłowska, Magdalena Hryhorowicz, Joanna Zeyland, Daniel Lipiński

Katedra Biochemii i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Opiekun naukowy: prof. dr hab. Ryszard Słomski

Natalia Mazurkiewicz: nmmazurkiewicz@gmail.com

Słowa Kluczowe: ksenotransplantacje, świnia domowa, zwierzęta transgeniczne

### **Streszczenie**

Przez wiele lat rozwoju medycyny nie rozwiązano problemu dotyczącego niedoboru organów do przeszczepów. W związku z tym powstała koncepcja przeszczepiania komórek, tkanek i narządów od zwierząt, co określa się mianem ksenotransplantacji. Do tego celu wybrano świnie domową (*Sus scrofa domestica*) ze względu na podobieństwo jej organów do narządów człowieka. Tym samym powstało wyzwanie, które polega na zniwelowaniu różnic międzygatunkowych powodujących odrzucenie ksenograftów przez układ immunologiczny człowieka. Jeden z rodzajów takiego odrzucenia – odrzucenie komórkowe opiera się o reakcje odpornościowe z udziałem makrofagów człowieka, czyli komórek fagocytycznych. Szereg badań wykazał, że reakcję tę można zahamować poprzez wykorzystanie właściwości białka CD47 człowieka. Owe białko błonowe jest ligandem receptora SIRP $\alpha$  (sygnałowe białko regulatorowe alfa) występującego na powierzchni komórek makrofagów. W momencie połączenia się CD47 człowieka z SIRP $\alpha$  makrofagów człowieka następuje zainicjowanie sygnału hamującego fagocytozę rozpoznanych w ten sposób komórek. Niniejsza praca wyjaśnia mechanizm tej inhibicji oraz wyjaśnia możliwość jego zastosowania w ksenotransplantacjach.

### **1. Wstęp**

Problemem współczesnej transplantologii jest przede wszystkim brak wystarczającej ilości narządów, tkanek i komórek używanych do przeszczepów. Mimo coraz większej wiedzy oraz możliwości wykonywania przeszczepów, niedobór tych narządów sprawia, że liczba pacjentów oczekujących na przeszczep ciągle wzrasta. Dlatego też, aby rozwiązać ten problem, zaczęto rozważać wykorzystanie zwierząt jako potencjalnych dawców narządów, tkanek i komórek dla ludzi. Przeszczepy pomiędzy osobnikami należącymi do różnych gatunków nazywane są ksenotransplantacjami (Cooper i in. 2016).

Pojęcie ksenotransplantacja pochodzi od greckiego *xenos* oznaczającego obcy, inny. U.S. Public Health Service definiuje ją jako każdy zabieg, polegający na transplantacji, implantacji lub infuzji biorcy – człowiekowi – komórek, tkanek lub organów odzwierzęcych, również płynów ustrojowych, tkanek, narządów lub ich fragmentów oraz komórek ludzkich, które miały kontakt *ex vivo* z organami, tkankami lub komórkami zwierzęcymi (Cooper, Ekser i Tector 2015).

Zwierzęciem, które najlepiej spełnia kryteria przydatności do ksenotransplantacji jest świnia domowa (*Sus scrofa domestica*). Świnie i ludzie mają narządy podobnej wielkości mimo dużego oddalenia filogenetycznego, a ich metabolizm wykazuje wiele podobieństw. Dobrym przykładem tego podobieństwa jest praca nerek (podobna osmomolarność moczu, filtracja w kłębkach nefronów oraz ilość krwi przepływającej przez nerkę). Jednak duża niezgodność immunologiczna związana z różnicami, między innymi w układach zgodności tkankowej świnie (SLA, z ang. *swine leukocyte antigens*) oraz człowieka – HLA, uniemożliwia bezpośrednie przeszczepy ksenogeniczne w układzie świnia-człowiek. Aby wyeliminować barierę immunologiczną stosowane są różne procedury inżynierii genetycznej. Istnieje możliwość transgeniezy tych zwierząt, dzięki czemu można otrzymać osobniki, które będą wykazywały cechy umożliwiające wykonywanie ksenoprzyszczepów. Ponadto

w stosunkowo krótkim czasie można otrzymać dużą ilość potomstwa - po 114 dniach ciąży aż 6-12 potencjalnie transgenicznych osobników. Dodatkową zaletą świń w tym kontekście jest osiągnięcie dojrzałości płciowej już w wieku 7 miesięcy (Smorąg i in. 2011). Co więcej – utrzymanie i prowadzenie hodowli świń jest stosunkowo łatwe. Duża odległość filogenetyczna wpływa na zmniejszone ryzyko zakażeń wirusowych, co jest kolejną zaletą wpływającą na wybór tego zwierzęcia (Houdebine 2005). Ponadto istnieją małe zastrzeżenia etyczne związane z wykorzystaniem tych zwierząt w ksenotransplantacjach. Obecnie badacze skupiają się na uzyskaniu transgenicznych świń, których organy, tkanki i komórki po przeszczepie do organizmu człowieka nie wywoływałyby reakcji immunologicznej (Smorąg i Słomski 2005).

## 2. Opis zagadnienia

Proces odrzucania ksenoprzeszczepu spowodowany jest odpowiedzią immunologiczną wywołaną reakcją układu odporności człowieka. Wyróżniamy cztery rodzaje odrzucenia przeszczepu: odrzucenie nadostre, ostre odrzucenie naczyń, ostre odrzucenie komórkowe oraz odrzucenie przewlekłe. Podziału dokonano ze względu na:

- różnice w czasie, jaki prowadzi do niewydolności narządu, który został przeszczepiony,
- różnice w mechanizmie powstawania,
- typowe cechy morfologiczne tkanek uwidocznionych na obrazach histopatologicznych (Jasiński et al. 2006).

Odrzucanie nadostre – HAR (z ang. *hyperacute rejection*) obserwowane jest w ciągu kilku minut od wykonania przeszczepu i prowadzi do niewydolności organu. Pojawiają się zmiany w obrębie naczyń krwionośnych, a dokładniej naczyń włosowatych i niewielkich tętnic. Przyczyną nadostrego odrzucenia jest aktywacja układu dopełniacza poprzez przeciwciała, które skierowane są przeciwko cząsteczkom MHC oraz swoistym antygenom powierzchniowym śródbłonna (Platt i in. 1991). W przypadku ksenoprzeszczepów od świni wystąpienie tego typu odrzucenia przeszczepu związane jest z obecnością w krwioobiegu człowieka przeciwciał przeciwko antygenowi Gal. Epitop Gal występuje na powierzchni komórek wszystkich zwierząt, z wyjątkiem człowieka i innych naczelnych. Jest on prezentowany na błonowych glikoproteinach oraz glikolipidach. Większość przeciwciał, które biorą udział w reakcji z przeszczepionym od świni narządem, skierowana jest przeciwko epitopowi Gal. Stanowi to około 80% odpowiedzi immunologicznej (Fujimura et al. 2008). Epitop Gal syntetyzowany jest przez enzym -  $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferazę, kodowany przez gen *GGTA1*. Enzym -  $\alpha 1,3$ -galaktozylotransferaza – katalizuje reakcję przeniesienia reszty galaktozy z UDP-Gal (urydylo difosforanu) na glikolipidy i glikoproteiny błonowe poprzez wiązanie  $\alpha 1-3$  (Macher i Galili 2008).

Ostre odrzucenie naczyń lub wewnątrznaczyniowe (z ang. *acute vascular rejection* – AVR lub w przypadku ksenotransplantów – z ang. *delayed xenograft rejection* – DXR) ma miejsce, gdy opanowane zostanie odrzucenie nadostre. Zwane jest również odrzuceniem humoralnym zależnym od przeciwciał. Odrzucenie to ma miejsce po upływie kilku do kilkunastu godzin od wykonania przeszczepu (Platt, Lin i McGregor 1998). W odróżnieniu od odrzucenia HAR, naczyńowe nie jest związane z układem dopełniacza i jest w pełni zależne od przeciwciał, komórek NK (z ang. *Natural Killer* – naturalni zabójcy) oraz makrofagów. W przypadku ksenotransplantacji w początkowym etapie następuje wiązanie się przeciwciał anty-Gal obecnych w krwioobiegu człowieka z epitopem Gal występującym na powierzchni komórek organu dawcy. Kompleks przeciwciało-antygen uruchamia kaskadę ostrego odrzucenia wewnątrznaczyniowego (Lin i in. 2000).

Kolejną odpowiedzią jest ostre odrzucenie komórkowe (ACR, z ang. *acute cellular rejection*), które występuje po kilku dniach od przeprowadzenia procedury transplantacyjnej. Jest ono zależne od makrofagów oraz limfocytów T, które charakteryzują się ekspresją markerów aktywacji takich jak: CD8+ i CD4+ (Friedman i in. 1999).

Odrzucenie przewlekłe (z ang. *chronic rejection*) następuje w około rok po wykonaniu transplantacji i związane jest z przewlekłą niewydolnością organu lub tkanek pochodzących od dawcy. Ten typ występuje najczęściej w odpowiedzi na przeszczep allogeniczny. Spowodowany jest zarówno przez czynniki immunologiczne, jak i nieimmunologiczne (Hancock 1997).

### 3. Przegląd literatury

W ostrym odrzuceniu naczyniowym oraz odrzuceniu komórkowym biorą udział makrofagi, co stanowi dużą przeszkodę w ksenotransplantacjach. Makrofagi to jednojądrzaste komórki żerne odpowiadające za fagocytozę komórek uznanych za obce, patogeniczne (Koyamada i in. 2005). Stanowią one populację komórek w układzie immunologicznym, która wywodzi się od prekursorów – monocytów i bierze udział w procesach odporności wrodzonej i nabytej. Różnicowanie makrofagów zależy od mikrośrodowiska, w którym znajdują się ich prekursorzy. Makrofagi prezentują na powierzchni cząsteczki HLA klasy II oraz białka regulujące aktywność limfocytów T i częściowo komórek dendrytycznych. Makrofagi odpowiadają za utrzymywanie stanu homeostazy w tkankach dzięki obecności na ich powierzchni receptorów rozpoznających komórki apoptotyczne, bakterie i inne komórki uznane za patogenne. W następstwie rozpoznania takich komórek są one likwidowane przez makrofagi na drodze fagocytozy. Po odróżnicowaniu makrofagi krążą we krwi przez kilka godzin do kilku lat w zależności od odpowiedzi immunologicznej, w której biorą udział (Wang i in. 2007; Martinez-Marin i in. 2017).

Wyróżnia się dwie subpopulacje komórek makrofagów: M1 oraz M2. Typ pierwszy powstaje w wyniku aktywności powierzchniowych receptorów Toll-podobnych (TLR, a ang. *Toll-like receptors*) w odpowiedzi na infekcje bakteryjne, a także w wyniku oddziaływania interferonu  $\gamma$  oraz pod wpływem czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, z ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*). Ponadto makrofagi typu M1 mogą powstać po oddziaływaniu z aktywiną – wielofunkcyjnym czynnikiem wzrostu (TGF, z ang. *transforming growth factor*), który ma również właściwości hamujące różnicowanie makrofagów w typ M2. Drugi typ powstaje w wyniku odpowiedzi na czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów (M-CSF, a ang. *macrophage colony-stimulating factor*). Wyróżniamy kilka podtypów tej polaryzacji makrofagów. Najbardziej powszechny podtyp to M2a, dla którego charakterystyczna jest obecność antygenów MHC-II na powierzchni komórek oraz wydzielanie interleukiny IL-10. Kolejnym podtypem jest M2b, który powstaje po stymulacji receptorów TLR monocytów specyficznymi ligandami. Makrofagi typu M2b charakteryzują się wydzielaniem IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 i IL-10. Trzecim podtypem jest M2c powstający po oddziaływaniu z IL-10. Komórki te odpowiadają za wydzielanie IL-10 (autosprężenie) oraz TGF $\beta$ . Różnorodność fenotypowa wśród komórek makrofagów jest powszechna. Przykładowo makrofagi typu M2, które wywodzą się z monocytów krążących we krwi posiadają na powierzchni białko CD206 i mają zdolność kierunkowania limfocytów T CD4 $^{+}$  w limfocyty T regulacyjne (Treg). Takich właściwości nie wykazują makrofagi powstałe z monocytów osiadłych, co więcej nie posiadają one na powierzchni swoich komórek białka CD206 (Wang i in. 2007; Kopeć-Szłęczak 2014).

W celu ograniczenia odpowiedzi immunologicznej z udziałem makrofagów, która może wystąpić u człowieka po wykonaniu przeszczepu komórek, tkanek lub organów od świni można wykorzystać właściwości białka SIRP $\alpha$ , które jest inhibitorem makrofagów. SIRP $\alpha$  należy do rodziny białek sygnałno-regulatorowych oraz nadrodziny immunoglobulin. Jest glikoproteiną transmembranową o charakterze receptorowym. Sygnałowe białko regulatorowe alfa - SIRP $\alpha$  (znane również jako CD172a) po raz pierwszy zidentyfikowano jako białko błonowe obecne głównie na makrofagach i komórkach mieloidalnych. Białka te posiadają domeny fosfataz SHP-1 i SHP-2, początkowo nazywano je również SHPS-1. SIRP $\alpha$  zawiera również trzy domeny Ig-podobne, pojedynczy region transbłonowy i region cytoplazmatyczny, który zawiera cztery reszty tyrozyny z tyrozynowymi, immunoreceptorowymi motywami hamującymi (ITIM), strukturę, która odpowiada za funkcje regulatorowe białka SIRP $\alpha$  jako receptora hamującego (Barclay i Van den Berg 2014).

Ligand dla białka SIRP $\alpha$  zidentyfikowano jako CD47 niezależnie u myszy, człowieka i szczura. Ligand ten był również znany jako białko związane z integryną (IAP), ponieważ jest związany z integrynami, takimi jak  $\alpha_3\beta_3$ . Wysoką ekspresję antygeny CD47 można zaobserwować w komórkach nowotworowych, w których to po raz pierwszy został zidentyfikowany. Molekularnie składa się z pięciu regionów transbłonowych i jednej domeny Ig-podobnej, która odpowiada za oddziaływanie z receptorem SIRP $\alpha$ . Oddziaływanie ligandu CD47 z receptorem SIRP $\alpha$  makrofagów odgrywa rolę w kontrolowaniu procesu fagocytozy. Obecność CD47 człowieka na powierzchni

komórek pełni funkcję inhibitora fagocytozy i prowadzi do powstania sygnału, dzięki któremu komórka posiadająca ten ligand rozpoznawana jest przez makrofagi jako bezpieczna. Potwierdzają to badania na myszach, w trakcie których transfuzowano erythrocyty, u których CD47 człowieka występował na powierzchni komórek. Po kilku godzinach wykazano, że erythrocyty te zostały usunięte z krwioobiegu myszy. Natomiast w przypadku erythrocytów człowieka nieposiadających CD47 na powierzchni okazało się, że przetrwały w organizmie myszy przez 60-80 dni. Tak więc można wnioskować, że komórki dawcy będą podatne na fagocytozę przez makrofagi biorcy w przeszczepach ksenogenicznych, jeśli na powierzchni komórek dawcy nie będzie obecny CD47 biorcy i nie dojdzie do interakcji tego ligandu z makrofagowym receptorem SIRP $\alpha$  (Wang i in. 2007; Barclay i Van den Berg 2014).

Aby zapobiec tej fagocytozie, białko SIRP $\alpha$  człowieka musi połączyć się z ligandem – CD47 człowieka. Oddziaływanie CD47 z białkiem SIRP $\alpha$  zapoczątkowałoby sygnał inhibicji, który zapobiegałby aktywacji makrofagów. Niezgodności międzygatunkowe prowadzą do zaburzenia pełniej funkcjonalności CD47 świni w organizmie człowieka, co skutkuje fagocytozą komórek ksenoprzeszczepu. Wprowadzenie genu kodującego antygen powierzchniowy CD47 człowieka do genomu świni może rozwiązać ten problem. Przeprowadzono badania *in vitro*, które sugerują, że potencjalna niekompatybilność między świńskim CD47, a ludzkim SIRP $\alpha$  może stanowić barierę dla ksenotransplantacji układzie świnia - człowiek. Podczas doświadczeń, myszy były biorcami erythrocytów i komórek limfoblastoidalnych świni. Wykazano, że SIRP $\alpha$  obecny na makrofagach myszy nie rozpoznaje CD47 świni obecnego na powierzchni przeszczepionych komórek skutkując ich fagocytozą. Inną sytuację otrzymano wprowadzając gen kodujący CD47 myszy do genomu świni. Tak zmodyfikowane komórki po przeszczepie do myszy nie ulegały fagocytozie. Zgodnie z tymi obserwacjami można wywnioskować, że ekspresja CD47 człowieka w komórkach świni może zahamować odrzucenie ksenoprzeszczepu z udziałem makrofagów w organizmie człowieka (Tena i in. 2014; Ide i in. 2007).

Biorąc pod uwagę ograniczoną zgodność w sekwencjach aminokwasowych między CD47 świni i człowieka, która wynosi 73% postawiono hipotezę, że niezgodność międzygatunkowa w sekwencji CD47 może przyczynić się do odrzucenia komórek ksenogenicznych przez makrofagi. Istnieją badania *in vitro*, w których wykazano, że CD47 świni nie indukuje fosforylacji tyrozyny w białku SIRP $\alpha$  człowieka pochodzącym z linii komórkowej makrofagów człowieka. Ponadto, wykazano, że ekspresja CD47 człowieka w komórkach świni radykalnie zmniejsza podatność komórek świni na fagocytozę przez makrofagi człowieka. Wyniki te wskazują na to, że niezgodność międzygatunkowa w obrębie CD47 istotnie przyczynia się do odrzucenia komórek ksenogenicznych przez makrofagi człowieka. Wprowadzenie CD47 człowieka do genomu świni i jego ogólnoustrojowa ekspresja mogłaby zapewnić właściwe działanie sygnałne występujące po połączeniu się obecnego wtedy na powierzchni komórek świni CD47 człowieka z SIRP $\alpha$  makrofagów człowieka. To podejście zapewniłoby wyeliminowanie problemu odrzucenia przeszczepu ksenogenicznego za pośrednictwem makrofagów (Ide i in. 2007; Koyamada i in. 2005).

#### **4. Podsumowanie**

Postępujące badania w zakresie ksenotransplantacji przybliżają naukowców do otrzymania zwierząt zmodyfikowanych użytecznych w przeszczepach w układzie świnia –człowiek. W związku z ciągle narastającym problemem niedoboru narządów do przeszczepów coraz większe nadzieje pokładane są w tych badaniach. Dla sukcesu równie ważne jest zrozumienie wszystkich mechanizmów odpowiadających za odpowiedź immunologiczną człowieka na ksenoprzeszczep. Jednym z nich jest inhibicja reakcji odpornościowej z udziałem makrofagów człowieka za pomocą białka CD47 człowieka. Z przeprowadzonych przez różne ośrodki badań dotyczących inhibicji makrofagów wynika, że otrzymanie świń transgenicznych wykazujących ekspresję genu CD47 człowieka umożliwiłoby wyeliminowanie problemu odrzucenia komórkowego z udziałem makrofagów w odpowiedzi na ksenoprzeszczep.



Prezentowana praca uzyskała wsparcie finansowe z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (umowa nr INNOMED/I/17/NCBR/2014) ze środków Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka w ramach Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego.

## 5. Literatura:

- Barclay AN, Van den Berg TK (2014) The Interaction Between Signal Regulatory Protein Alpha (SIRP $\alpha$ ) and CD47: Structure, Function, and Therapeutic Target. *Annual Review of Immunology* 32 (1): 25–50.
- Cooper DKC, Ekser B, Ramsoondar J, et al. (2016) The Role of Genetically Engineered Pigs in Xenotransplantation Research. *Journal of Pathology* 238 (2): 288–299.
- Cooper DKC, Ekser B, Tector J (2015) A Brief History of Clinical Xenotransplantation. *International Journal of Surgery* 23: 205–210.
- Friedman T, Shimizu A, Smith RN, et al. (1999) Human CD4+ T Cells Mediate Rejection of Porcine Xenografts. *Journal of Immunology* 162 (9): 5256–5262.
- Fujimura T, Takahagi Y, Shigehisa T, et al. (2008) Production of Alpha 1,3-Galactosyltransferase Gene-Deficient Pigs by Somatic Cell Nuclear Transfer: A Novel Selection Method for Gal Alpha 1,3-Gal Antigen-Deficient Cells. *Molecular Reproduction and Development* 75 (9): 1372–1378.
- Hancock WW (1997) Delayed xenograft rejection. *World journal of surgery*, 21(9): 917-923.
- Houdebine LM (2005) Use of Transgenic Animals to Improve Human Health and Animal Production. *Reproduction in Domestic Animals* 40(4): 269-281.
- Ide K, Wang H, Tahara H, et al. (2007) Role for CD47-SIRPalpha Signaling in Xenograft Rejection by Macrophages. *PNAS* 104 (12): 5062–5066.
- Jasiński A, Słomski R, Szalata M, et al. (2006) Transplantacja Narządów – Wyzwanie Dla Biotechnologii. *Biotechnologia* 1 (72): 7–28.
- Kopeć-Szłęczak J (2014) Makrofagi I Ich Rola W Układzie Krwiotwórczym. *Journal of Transfusion Medicine* 7 (3): 84–92.
- Koyamada N, Takayama SJ, Usuda M, et al. (2005) Macrophage Depletion Prevents Anti-Graft Antibody Production and Results in Long-Term Survival in Xenotransplantation. *Transplantation Proceedings* 37 (1): 514–515.
- Lin SS, Hanaway MJ, Gonzalez-Stawinski GV, et al. (2000) The Role of Anti-Galalpha1-3Gal Antibodies in Acute Vascular Rejection and Accommodation of Xenografts. *Transplantation* 70 (12): 1667–1674.
- Macher BA., Galili U (2008) The Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R ( $\alpha$ -Gal) Epitope: A Carbohydrate of Unique Evolution and Clinical Relevance. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1780 (2): 75–88.
- Martinez-Marin D, Jarvis C, Nelius T, et al. (2017) PEDF Increases the Tumoricidal Activity of Macrophages towards Prostate Cancer Cells in Vitro. *PLOS One* 12 (4): 1–22.
- Platt JL, Fischel RJ, Matas AJ, et al. (1991) Immunopathology of Hyperacute Xenograft Rejection in a Swine-to-Primate Model. *Transplantation* 52 (2): 214–220.
- Platt JL, Lin SS, McGregor CG (1998) Acute Vascular Rejection. *Xenotransplantation* 5 (3): 169–175.
- Smorąg Z, Słomski R (2005) Ksenotransplantacja – Możliwości I Ograniczenia. *Nauka* 4: 133–148.
- Smorąg Z, Słomski R, Jura J, et al. (2011) Transgeniczne Świnie Jako Dawcy Tkanek I Narządów Do Transplantacji U Ludzi. *Przegląd hodowlany* 11: 1–4.
- Tena A, Kurtz J, Leonard DA, et al. (2014) Transgenic Expression of Human CD47 Markedly Increases Engraftment in a Murine Model of Pig-to-Human Hematopoietic Cell Transplantation. *American Journal Transplant* 14 (12): 2713–2722.
- Wang H, Verhalen J, Madariaga ML, et al. (2007) Attenuation of Phagocytosis of Xenogeneic Cells by Manipulating CD47. *Transplantation* 109 (2): 836–843.

## **16. Rola ektosomów pochodzenia nowotworowego w angiogenezie**

The role of tumor-derived ectosomes in angiogenesis

Surman Magdalena, Przybyło Małgorzata

Zakład Biochemii Glikokoniugatów, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Opiekun naukowy: dr hab. Małgorzata Przybyło

Surman Magdalena: magdalena.surman@doctoral.uj.edu.pl

Słowa kluczowe: mikropęcherzyki błonowe, neoangiogeneza, śródbłonek naczyniowy

### **Streszczenie**

Wzrost guza nowotworowego uzależniony jest od dostarczania odpowiedniej ilości tlenu i substancji odżywczych do zwiększającej się masy komórek. Wymaga to rozbudowy istniejącej sieci naczyń krwionośnych w obrębie guza w procesie określanym mianem angiogenezy. Inicjacja procesu angiogenezy zapoczątkowana przez sygnały wysyłane przez komórki nowotworowe powoduje wzmoczoną proliferację i migrację komórek śródbłonka (endotelialnych) i doprowadza do budowy sieci naczyń podporządkowanych potrzebom nowotworu. Za jeden ze sposobów interakcji komórek nowotworowych z komórkami endotelialnymi uznaje się mikropęcherzyki błonowe (egzosomy i ektosomy) uwalniane przez komórki nowotworowe do przestrzeni pozakomórkowej. Mikropęcherzyki błonowe to niewielkie, otoczone fosfolipidową błoną koliste struktury, zdolne do przenoszenia bioaktywnych cząsteczek – białek, lipidów i kwasów nukleinowych, pomiędzy dowolnymi niesąsiadującymi komórkami organizmu. Liczne badania potwierdziły, że ektosomy (populacja mikropęcherzyków o średnicy w zakresie 100-1000 nm) mogą pośredniczyć w horyzontalnym transferze czynników promujących angiogenezę lub związków indukujących ich nadekspresję w komórkach endotelialnych. Towarzyszące temu zaburzenia w równowadze pomiędzy czynnikami pro- i antyangiogennymi stymulują proces angiogenezy, przyspieszając tym samym nie tylko wzrost guza, ale również wchodzenie komórek nowotworowych do światła naczyń krwionośnych (intrawazację) i tworzenie przerzutów.

### **1. Wstęp**

W trakcie progresji nowotworu zwiększaniu objętości guza towarzyszy zwykle rozbudowa sieci naczyń krwionośnych w obrębie zmienionej chorobowo tkanki, co określane jest mianem neoangiogenezy. Dzięki temu możliwe jest dostarczenie szeregu substancji niezbędnych do przeżycia komórek nowotworowych, a ponadto powstała nowa sieć naczyń umożliwia ich rozprzestrzenianie się po organizmie. Inicjacja procesu angiogenezy jest związana z aktywacją szeregu ścieżek sygnałowych w komórkach nowotworowych, co prowadzi do wzmoczonej proliferacji i migracji komórek wyścielających światło naczyń tj. komórek śródbłonka (endotelialnych) lub ich prekursorów.

Jednym z mechanizmów pozwalających na komunikację pomiędzy komórkami nowotworowymi a komórkami endotelialnymi jest uwalnianie przez komórki nowotworowe tak zwanych mikropęcherzyków błonowych do przestrzeni pozakomórkowej. Mikropęcherzyki błonowe są to niewielkie, otoczone fosfolipidową błoną koliste struktury, zdolne do przenoszenia bioaktywnych cząsteczek – białek, lipidów i kwasów nukleinowych (mRNA, miRNA, DNA), pomiędzy dowolnymi, niesąsiadującymi komórkami organizmu. Przekazanie wybranych sygnałów przez mikropęcherzyki może opierać się na interakcjach ligand-receptor, na fuzji mikropęcherzyka z błoną komórki docelowej lub jego endocytozie (Raposo i in. 2013; Minciacchi i in. 2015). Bez względu na mechanizm, mikropęcherzyki błonowe mogą modulować istotne procesy biologiczne w komórkach nowotworowych, a także w komórkach endotelialnych, zarówno poprzez transfer szeregu czynników o charakterze proangiogennym, jak i wywołując istotne zmiany w mikrośrodkowisku guza (Webber i in. 2015).

Wśród mikropęcherzyków błonowych wyróżnia się egzosomy, ektosomy oraz ciała apoptotyczne. Ich powstawanie związane jest w tworzeniem uwypukleń w zewnętrznej błonie komórkowej (ektosomy) lub w błonach przedziałów endosomalnych (egzosomy), a w przypadku ciałek apoptotycznych – z otoczeniem błoną komórkową całych fragmentów cytoplazmy, zawierających resztki chromatyny i funkcjonalne organella. Poza mechanizmem powstawania, głównym kryterium pozwalającym na klasyfikację poszczególnych typów pęcherzyków jest ich wielkość. Średnica najmniejszych pęcherzyków, egzosomów, waha się w zakresie 30-100 nm. Bardziej heterogenną populację stanowią ektosomy (0,1-1 µm), natomiast średnica największych ciałek apoptotycznych może wynosić nawet 5 µm (Raposo i in. 2013).

Przeważająca liczba oryginalnych prac opisuje wpływ jaki wywierają egzosomy na komórki endotelialne i sam proces neoangiogenezy, natomiast wiedza na temat udziału ektosomów jest stosunkowo niewielka. W poniższym rozdziale przedstawiono wyniki badań potwierdzające, że również ta populacja mikropęcherzyków odgrywa istotną rolę w procesie neoangiogenezy towarzyszącym progresji nowotworu.

## **2. Opis zagadnienia**

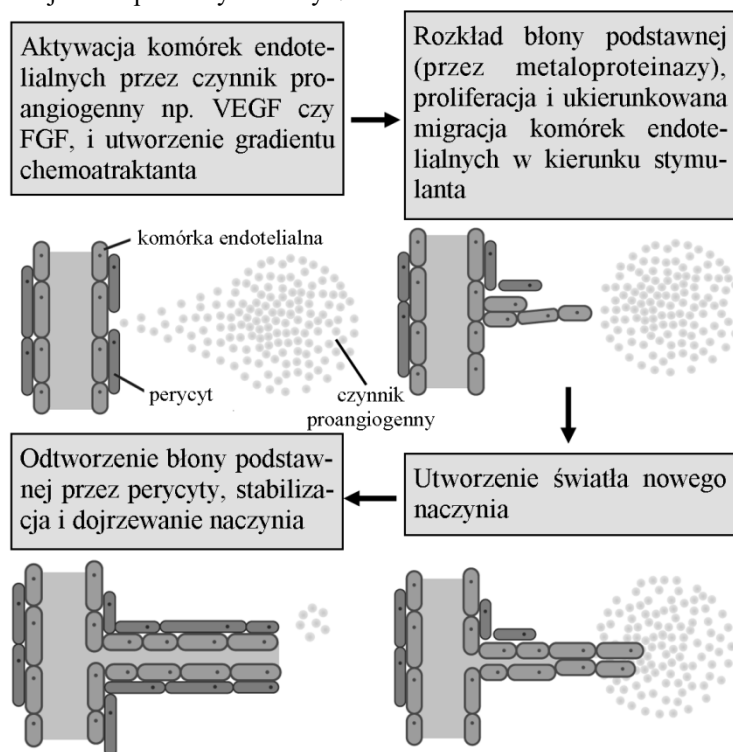
Nowe naczynia krwionośne w organizmie człowieka powstają w przebiegu trzech procesów: waskulogenezy, angiogenezy i arteriogenezy. Fizjologiczny proces waskulogenezy cechuje udział komórek macierzystych. W procesie waskulogenezy nowe naczynia krwionośne powstają przy udziale prekursorowych komórek śródbłonka (EPCs, ang. endothelial progenitor cells), wytwarzanych głównie w szpiku kostnym. Zaktywowane EPCs dostają się do krwi obwodowej i wbudowują w struktury powstających naczyń. Proces waskulogenezy zachodzi głównie podczas rozwoju embrionalnego, ale również postnatalnie (np. podczas gojenia ran czy dojrzewania oocytów w jajniku), doprowadzając do wytworzenia w rozwijającym się organizmie podstawowego układu naczyniowego. Angiogeneza, inaczej neowaskularyzacja lub naczyniotworzenie, to proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych z naczyń już istniejących, regulowany czynnikami pro- i antyangiogennymi. Arteriogeneza polega na powstawaniu dużych, dojrzałych naczyń krwionośnych (żył i tętnic) w wyniku przekształceń istniejących już naczyń kapilarnych, poprzez powiększanie ich światła i pogrubianie ścian. Arteriogeneza występuje najczęściej w przypadku rozwijającej się okluzji (zamknięcia światła) większych naczyń, umożliwiając wytworzenie krążenia obocznego (Jarosz i in. 2012).

Angiogeneza jest bardzo szerokim pojęciem, które obejmuje zarówno stany fizjologiczne, jak i patologiczne. W aspekcie fizjologicznym angiogeneza jest procesem niezbędnym do prawidłowego rozwoju, wzrostu i dojrzewania organizmu. U osób dorosłych występuje relatywnie rzadko, m.in. w trakcie wzrostu endometrium podczas cyklu menstruacyjnego kobiety oraz w procesie budowy łożyska u kobiet ciężarnych, a także podczas gojenia się ran i przywracania przepływu krwi w tkankach po urazach (D'Alessio i in. 2015). Proces naczyniotworzenia w zdrowym organizmie znajduje się pod ścisłą kontrolą czynników pro- oraz antyangiogennych (czynników wzrostu, chemokin, białek adhezyjnych, angiopoetyń) będących w równowadze. Ponadto, fizjologiczny proces angiogenezy, obok obecności czynników proangiogennych, wymaga także odpowiedniej liczby receptorów oraz obecności inhibitorów naczyniotworzenia będących w niskiej koncentracji.

Angiogeneza stanowi również element patogenezy wielu schorzeń. Odgrywa istotną rolę w rozwoju takich chorób jak reumatoidalne zapalenie stawów, łuszczyca, zapalenie błony śluzowej żołądka, nieswoiste zapalenie jelit, choroba niedokrwienna mięśnia sercowego, miażdżyca, endometrioza, retinopatia oraz cukrzyca. Tworzenie nowych naczyń krwionośnych jest również niezbędne do wzrostu guza w przebiegu chorób nowotworowych (D'Alessio i in. 2015). Proces angiogenezy może być inicjowany, gdy guz ma zaledwie kilkadziesiąt komórek, a pierwsze naczynia powstają, gdy składa się on z kilkuset komórek. Dzięki licznym badaniom prowadzonym zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, możliwe było opisanie przebiegu angiogenezy i jego podziału na 5 zasadniczych etapów (Ryc. 1) (Zielonka i in. 2003):

1. Zwiotczenie ściany istniejącego naczynia i aktywacja komórek endotelialnych – komórki śródbłonka aktywowane są przez wiele czynników fizycznych oraz humoralnych, takich

- jak hipoglikemia (zbyt niskie stężenie glukozy we krwi), hipoksja (niedotlenienie tkanki), stan zapalny czy proangiogenne czynniki wzrostu, np. czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (VEGF, ang. vascular endothelial growth factor) i czynnik wzrostu fibroblastów (FGF, ang. fibroblast growth factor).
2. Degradacja błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej – zachodzi w wyniku aktywacji enzymów proteolitycznych – metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. MMPs, matrix metalloproteinases).
  3. Migracja i proliferacja komórek endotelialnych – w wyniku proteolizy macierzy zewnątrzkomórkowej powstają produkty o działaniu chemotaktycznym ukierunkowujące migrację komórek śródbłónka, w której pośredniczą cząsteczki adhezyjne (integryny, E-selektyna), umożliwiające wiązanie do specyficznych składników macierzy zewnątrzkomórkowej (np. fibronektyny, lamininy); równoczesna proliferacja komórek endotelialnych prowadzi do wytworzenia ściany nowopowstającego naczynia krwionośnego.
  4. Tworzenie rurkowatych struktur nowego naczynia – dochodzi do wytworzenia światła naczyń krwionośnych (tworzą się ciągle, wydłużone, rurkowate struktury).
  5. Otoczenie naczynia przez komórki mezenchymalne – komórki śródbłónka dojrzewają, wytwarza się błona podstawna oraz wbudowywane są perycyty, których zadaniem jest stabilizacja nowopowstałych naczyń.



**Rys. 1.** Sekwencyjny charakter procesu angiogenezy.

Nowopowstałe naczynia w obrębie guza nowotworowego różnią się strukturą i właściwościami od prawidłowych naczyń w podstawowym układzie krwionośnym organizmu. Komórki endotelialne mają zmienny i nieregularny kształt, zróżnicowany rozmiar, posiadają nieszczelną błonę podstawną oraz szerokie połączenia międzykomórkowe. A sama sieć naczyniowa guza cechuje się wysoką nieregularnością, niepełnym zróżnicowaniem tętniczo-żylnym i niską prędkością przepływu krwi. Dodatkowo, ze względu na obecność licznych porów przepuszczalność naczyń krwionośnych w obrębie guza jest wyższa niż w prawidłowych tkankach, co sprzyja

procesowi wykrzepiania (naczynia są przepuszczalne dla plazminogenu, fibrynogenu i płytek krwi) oraz intrawazacji (wejściu) komórek nowotworowych do światła naczynia, co z kolei umożliwia powstawanie guzów wtórnych (Jarosz i in. 2012).

Dotychczasowe badania nad przebiegiem i molekularnymi mechanizmami angiogenezy pozwoliły zidentyfikować typy komórek, rodzaje cząsteczek i inne czynniki modulujące ten proces. Jednym z nowych kierunków badań dotyczących angiogenezy jest analiza proangiogennego wpływu mikropęcherzyków błonowych. Uwolnione do przestrzeni zewnątrzkomórkowej mikropęcherzyki stanowią integralny element homeostazy i obok oddziaływań auto-, para- oraz endokrynych, pełnią istotną rolę w komunikacji międzykomórkowej. Transportowane przez nie bioaktywne cząsteczki umożliwiają stymulację różnych szlaków sygnalizacyjnych w komórce docelowej, regulację jej metabolizmu, a także kontrolę ekspresji genów i syntezy białek. Istotne zmiany w ilości bądź molekularnym składzie uwalnianych mikropęcherzyków zaobserwowano w wielu stanach chorobowych, co wskazuje na ich diagnostyczny i terapeutyczny potencjał. W przypadku procesu karcynogenezy, mikropęcherzyki przyczyniają się do licznych zmian w mikrośrodkowisku guza i modulują odpowiedź immunologiczną organizmu. Mogą zwiększać inwazyjność i migrację komórek nowotworowych, a także sprzyjać angiogenezie i tworzeniu przerzutów (Anzi i in. 2013; Surman i in. 2017).

Ektosomy to populacja mikropęcherzyków o średnicy w zakresie 100-1000 nm, które powstają najczęściej w obszarach błony zawierających duże ilości cholesterolu tzw. tratwach lipidowych. Do typowych białek przenoszonych przez ektosomy zalicza się m.in. flotilinę-1, czynnik tkankowy (TF, ang. tissue factor), integryny (głównie z podjednostką  $\beta 1$ ), metaloproteiny, chemokiny takie jak interleukina  $1\beta$ , oraz czynniki wzrostu (epidermalny, śródbłonna naczyń i fibroblastów). Powstawanie ektosomów jest związane ze zmianami w symetrii dwuwarstwy lipidowej tworzącej zewnętrzną błonę komórkową. W wyniku działania mechanizmu zależnego od ATP fosfatydyloseryna (PS) i fosfatydyloetanolamina (PE) ulegają translokacji do zewnętrznej warstwy błony komórkowej. Za translokację lipidów w obrębie błony odpowiadają zależne od jonów wapnia enzymy – flipaza, flopaza i skramblaza, a zwiększone stężenie wapnia w cytozolu powoduje zmiany w aktywności wymienionych enzymów. Aktywacja flopazy i skramblazy umożliwia eksternalizację fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy, podczas gdy inaktywacja flipazy uniemożliwia ich powrotną translokację do wewnętrznej warstwy lipidowej. Utrata asymetrii błony w połączeniu z jednoczesną reorganizacją cytoszkieletu (przy udziale gelsoliny i kalpajny), umożliwia formowanie i uwalnianie dojrzałych ektosomów do przestrzeni pozakomórkowej (Wójtowicz i in. 2014).

### **3. Przegląd literatury**

Na przestrzeni lat zidentyfikowano wiele różnych czynników biorących udział w stymulacji procesu angiogenezy. Do najważniejszych należą czynniki wzrostu: VEGF, FGF i płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF, ang. platelet-derived growth factor), angiopoetyny 1 i 2, interleukiny 6 i 8, angiogenina, czynnik martwicy nowotworów (TNF, ang. tumor necrosis factor) oraz transformujący czynnik wzrostu (TGF, ang. transforming growth factor). W stymulacji angiogenezy biorą również udział enzymy – głównie metaloproteiny macierzy międzykomórkowej oraz białka adhezyjne należące do rodziny integryny. Wśród czynników hamujących proces angiogenezy wymienia się m.in. inhibitor wzrostu komórek śródbłonna (VEGI, ang. vascular endothelial growth inhibitor), interferony  $\alpha$ ,  $\beta$  oraz  $\gamma$ , endostatynę, angiostatynę, wazostatynę, trombospondynę1 oraz tkankowe inhibitory metaloproteinaz (Jarosz i in. 2012).

Czynniki stymulujące i hamujące proces angiogenezy nowotworowej mogą być produkowane zarówno przez komórki nowotworowe, jak i prawidłowe komórki gospodarza, a są one przekazywane na drodze oddziaływań auto-, para- i endokrynych. Liczne badania potwierdziły, że również ektosomy mogą pośredniczyć w horyzontalnym transferze wielu z wyżej wymienionych czynników o charakterze proangiogenym lub wywoływać ich nadekspresję w komórkach endotelialnych. Taraboletti i in.(2006) wykazali, że ektosomy wyizolowane z dwóch linii komórkowych raka jajnika (CABA1, A2780) zawierały znaczne ilości VEGF oraz metaloproteinaz (MMP-2, MMP-9), które są odpowiedzialne za degradację składników macierzy

zewnątrzkomórkowej. Działaniu tych trzech czynników było odpowiedzialne za zwiększoną ruchliwość i inwazyjność komórek endotelialnych w obrębie sztucznej błony podstawnej Matrigel (Taraboletti i in. 2006). W innych badaniach komórki śródbłonna wyizolowane z żyły pępowinowej (HUVEC, ang. human umbilical vein endothelial cells) wykazywały zwiększoną ekspresję VEGF po inkubacji z ektosomami uwalnianymi przez komórki raka kolczystokomórkowego skóry (A431) i raka gruczołowego płuc (A549), które to przenosiły onkogeną formę epidermalnego czynnika wzrostu (EGFRvIII, ang. epidermal growth factor variant III) (Al-Nedawi in. 2009). Proangiogeny fenotyp komórek HUVEC ujawniał się również po inkubacji z ektosomami izolowanymi z hodowli dwóch linii komórkowych raka jajnika (OVCAR3, SKOV3). Mikropęcherzyki przenoszące aktywator metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (EMMPRIN, ang. extracellular matrix metalloproteinase inducer) stymulowały proliferację, inwazyjność i ekspresję MMP-2 i MMP-9 w komórkach endotelialnych (Millimaggi i in. 2007). Za kolejny proangiogeny czynnik, którego ekspresja może wzrastać pod wpływem mikropęcherzyków, uznaje się interleukinę 6 (IL-6). Ektosomy izolowane z hodowli komórek szpiczaka mnogiego stymulowały ekspresję IL-6 i VEGF w endotelialnej linii EA.hy926, czego efektem była wzmożona proliferacja i inwazyjność tych komórek (Liu i in. 2014).

Kluczową rolę mikropęcherzyków w procesie angiogenezy potwierdziły również badania na modelu zwierzęcym. Munster i in. (2014) wyizolowali ektosomy uwalniane przez komórki raka piersi (linia EMT/6) przed i po ekspozycji na przeciwciała anti-VEGF. Zgodnie z oczekiwaniami u myszy, którym zaaplikowano ektosomy uwolnione przez komórki przed inkubacją ze wspomnianymi przeciwciałami, zaobserwowano zwiększoną mobilizację komórek endotelialnych i większą gęstość naczyń krwionośnych w obrębie guza nowotworowego (Munster i in. 2014).

Znacznie mniej wiadomo o proangiogenym wpływie lipidów transportowanych za pośrednictwem ektosomów. Kim i in. (2002) zademonstrowali, że sfingomieliną przenoszona przez ektosomy izolowane z hodowli komórek mięsaka (HT1080) odpowiadała za zwiększoną migrację komórek endotelialnych i tworzenie naczyńopodobnych struktur na błonie Matrigel. Porównywalny efekt zaobserwowano w przypadku inkubacji komórek endotelialnych z ekstraktami lipidów błonowych i oczyszczoną sfingomieliną, a wyniki eksperymentu potwierdziła kontrola z użyciem sfingomielinazy tj. enzymu rozkładającego sfingomielinę (Kim i in. 2002).

Poza czynnikami wzrostu, metaloproteinazami, cytokinami i lipidami, proangiogeny efekt mogą wykazywać również transportowane za pośrednictwem mikropęcherzyków cząsteczki miRNA. Transfer miRNA z komórek nowotworowych do komórek endotelialnych może wpływać na ekspresję genów dla wielu czynników o działaniu anti- lub proangiogenym. Cząsteczka miR-29a/c obecna w ektosomach uwalnianych przez komórki raka żołądka hamowała translację mRNA dla VEGF w kilku liniach endotelialnych hodowanych w warunkach *in vitro*. Dodatkowo w mysim modelu raka żołądka podanie ektosomów przenoszących miR-29a/c dootrzewnowo skutkowało ograniczeniem rozwoju sieci naczyniowej guzów (Zhang i in. 2016). W przypadku ektosomów uwalnianych przez komórki raka okrężnicy, miR-1246 i TGF- $\beta$  stymulowały proangiogeny fenotyp komórek linii HUVEC poprzez aktywację ścieżki sygnałowej Smad 1/5/8 (Yamada i in. 2014).

#### **4. Podsumowanie i wnioski**

Krytycznym etapem w progresji choroby nowotworowej jest wchodzenia komórek nowotworowych do światła naczyń krwionośnych, co umożliwia tworzenia przerzutów. Zahamowanie rozwoju choroby na tym etapie znacząco poprawiłoby rokowania pacjentów, a zatem terapie antyangiogenne prowadzące do zmniejszenia bądź całkowitej regresji sieci naczyń krwionośnych w obrębie guza budzą wielkie nadzieje. Zahamowanie transportu składników odżywczych i tlenu do komórek nowotworowych zaburza zachodzące w nich procesy biologiczne, hamuje wzrost oraz ogranicza powstawanie przerzutów. Antyangiogenne strategie o charakterze bezpośrednim angażują inhibitory migracji i proliferacji komórek endotelialnych. Wykorzystywane leki indukują apoptozę (programową śmierć) komórek endotelialnych, uniemożliwiając tworzenie nowych naczyń krwionośnych bądź niszcząc struktury naczyń już istniejących. W terapiach o charakterze pośrednim stosowane są inhibitory czynników proangiogenych oraz ich receptorów

w komórkach nowotworowych oraz śródbłonku nowopowstających naczyń (Kubota 2012; Jarosz i in. 2012).

Identyfikacja kolejnych czynników proangiogennych w ektozomach umożliwi dokładniejsze poznanie mechanizmów regulujących proces patologicznej angiogenezy. Precyzyjne określenie roli ektozomów pochodzenia nowotworowego w interakcjach komórek nowotworowych i komórek endotelialnych może przyczynić się do opracowania pierwszych potencjalnych antyangiogennych terapii skierowanych przeciwko tej populacji mikropęcherzyków w celu ich późniejszego wykorzystania w leczeniu różnych typów nowotworów.

**Finansowanie:** Powstanie niniejszej pracy zostało sfinansowane ze środków Fundacji Studentów i Absolwentów UJ „Bratniak” oraz Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (K/DCS/004659).



## 5. Literatura

- Al-Nedawi K, Meehan B, Kerbel RS i in. (2009) Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl AcadSci USA*. 106: 3794–3799.
- Azmi AS, Bao B, Sarkar FH (2013) Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev*. 32: 623–642.
- D'Alessio A, Moccia F, Li JH i in. (2015) Angiogenesis and vasculogenesis in health and disease. *Biomed Res Int*. 2015: 126582.
- Jarosz P, Woźniak B (2012) Angiogeneza w chorobach nowotworowych. *Prz Med. Uniw Rzesz Inst Leków*, 2012, 4, 498–507.
- Kim CW, Lee HM, Lee TH i in. (2002) Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res* 62: 6312–6317.
- Kubota Y (2012) Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. *Keio J Med*. 61: 47–56.
- Liu Y, Zhu XJ, Zeng C i in. (2014) Microvesicles secreted from human multiple myeloma cells promote angiogenesis. *ActaPharmacol Sin* 35: 230–238.
- Millimaggi D, Mari M, D'Ascenzo S i in. (2007) Tumor vesicle associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells. *Neoplasia*. 9: 349–357.
- Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D (2015) Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 40: 41–51.
- Munster M, Fremder E, Miller V i in. (2014) Anti-VEGF-A affects the angiogenic properties of tumor-derived microparticles. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0095983.
- Surman M, Stępień E, Hoja-Łukowicz D i in. (2017) Deciphering the role of ectosomes in cancer development and progression: focus on the proteome. *ClinExp Metastasis*. 34: 273–289.
- Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 200: 373–383.
- Taraboletti G, D'Ascenzo S, Giusti i in. (2006) Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. *Neoplasia*. 8: 96–103.
- Webber J, Yeung V, Clayton A (2015) Extracellular vesicles as modulators of the cancer microenvironment. *Semin Cell Dev Biol*. 40: 27–34.
- Wójtowicz A, Baj-Krzyworzeka M, Baran J (2014) Characterization and biological role of extracellular vesicles. *Postepy Hig Med Dosw*. 68: 1421–1432.
- Yamada N, Tsujimura N, Kumazaki M i in. (2014) Colorectal cancer cell-derived microvesicles containing microRNA-1246 promote angiogenesis by activating Smad 1/5/8 signaling elicited by PML down-regulation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1839: 1256–1272.

- Zhang H, Bai M, Deng T i in. (2016) Cell-derived microvesicles mediate the delivery of miR-29a/c to suppress angiogenesis in gastric carcinoma. *CancerLett.* 375: 331–339.
- Zielonka T (2003) Angiogeneza – Część I. Mechanizm powstawania nowych naczyń krwionośnych. *Alergia Astma Immunologia.* 8: 169-174.



## **17. Znaczenie glikozylacji białek w biologii mikropęcherzyków błonowych**

The biology of extracellular vesicles: the role of protein glycosylation

Surman Magdalena, Przybyło Małgorzata

Zakład Biochemii Glikokoniugatów, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii,  
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Opiekun naukowy: dr hab. Małgorzata Przybyło

Surman Magdalena: magdalena.surman@doctoral.uj.edu.pl

Słowa kluczowe: glikokoniugaty, ektosomy, egzosomy, sortowanie białek

### **Streszczenie**

Przyłączanie reszt cukrowych do łańcuchów polipeptydowych (glikozylacja) jest jedną z najczęstszych i najbardziej złożonych potranslacyjnych modyfikacji białek. Glikozylacja odgrywa kluczową rolę w szerokim spektrum procesów biologicznych, począwszy od adhezji komórek do macierzy zewnątrzkomórkowej do interakcji białko-ligand. Zmiany w profilu glikozylacji białek są cechą towarzyszącą wielu stanom patologicznym, w tym chorobom nowotworowym. Niektóre glikoproteiny i proteoglikany mogą ulegać inkorporacji do mikropęcherzyków błonowych – niewielkich, otoczonych fosfolipidową błoną kolistych struktur, uwalnianych do przestrzeni międzykomórkowej przez większość komórek ludzkiego organizmu. Wyniki ostatnich badań jednoznacznie wskazują, że mikropęcherzyki błonowe są nośnikami szeregu białek związanych ze specyficznymi strukturami cukrowymi, niewiele natomiast wiadomo o biologicznym znaczeniu ich glikozylacji. W poniższym rozdziale scharakteryzowano przebieg procesu glikozylacji oraz podsumowano wyniki badań dotyczących wpływu glikozylacji białek obecnych w mikropęcherzykach błonowych na proces ich sortowania, oddziaływanie mikropęcherzyków z komórkami docelowymi oraz potencjał diagnostyczny tych struktur cukrowych.

### **1. Wstęp**

Cukry stanowią jedną z największych grup związków organicznych występujących w organizmach żywych, u których to pełnią kluczową rolę w większości procesów życiowych, będąc czymś więcej niż tylko głównym materiałem budulcowym i energetycznym. Wchodzą one również w skład glikoniugatów – makrocząsteczek zawierających w swej strukturze co najmniej jeden łańcuch cukrowy (glikan) przyłączony kowalencyjnie do polipeptydów (w glikoproteinach i proteoglikanach), lub do lipidów (w glikolipidach).

Wszystkie glikokoniugaty są produktem procesu glikozylacji, czyli enzymatycznego przyłączania glikanów do białek i lipidów. W przypadku białek, glikozylacja jest ich najczęstszą potranslacyjną modyfikacją, w wyniku której różnorodne struktury cukrowe zostają przyłączone do nawet 50% nowopowstających łańcuchów polipeptydowych. Obecność reszt cukrowych na powierzchni białka zmienia jego właściwości fizyczne, w tym jego wielkość, konformację, rozpuszczalność i ładunek elektryczny. Pod względem biologicznym, glikozylowane białka mogą natomiast różnić się poziomem sekrecji, stopniem sfałdowania czy immunogennością, a w niektórych przypadkach glikozylacja powoduje, że pełnią one bardzo specyficzne funkcje. Na przykład hormony ssaków, będące glikoproteinami (np. gonadotropiny) występują najczęściej w formie dimerycznej i to właśnie glikany są odpowiedzialne za połączenie dwóch cząsteczek (monomerów), a ponadto zapewniają one oporność tych hormonów na proteolizę. Glikozylacja odgrywa również istotną rolę we wzajemnym rozpoznawaniu się komórek (np. w trakcie tworzenia przetrzutów nowotworowych) oraz procesie zapłodnienia, który to w pewnym stopniu zależy od wiązania się łańcuchów cukrowych znajdujących się na powierzchni oocyty i plemnika (Ohtsubo i in. 2006).

Addycja określonych glikanów determinuje również lokalizację nowopowstających białek w komórkach eukariotycznych. Większość glikoprotein to białka transbłonowe (ich część cukrowa jest eksponowana na zewnątrz komórki), a tylko niewiele z nich (głównie białka o aktywności enzymatycznej) jest na stałe zlokalizowanych w cytoplazmie. Niektóre z przyłączonych

glikanów mogą służyć jako markery decydujące o sortowaniu glikoproteiny do poszczególnych kompartmentów komórkowych lub o ich sekrecji na zewnątrz. W kontekście różnych mechanizmów sekrecji, wybrane glikoproteiny i proteoglikany mogą m.in. ulegać inkorporacji do mikropęcherzyków błonowych. Są to niewielkie, otoczone fosfolipidową błoną kolistą struktury, uwalniane przez większość komórek ludzkiego organizmu do przestrzeni międzykomórkowej, skąd dostają się do większości płynów ustrojowych. m.in. krwi, moczu czy płynu mózgowo-rdzeniowego.

Mikropęcherzyki błonowe pośredniczą w międzykomórkowym transporcie szeregu bioaktywnych cząsteczek (białek, lipidów, kwasów nukleinowych) oraz wpływają na przebieg różnych procesów fizjologicznych i patologicznych w komórkach docelowych. Wyniki ostatnich badań jednoznacznie wskazują, że mikropęcherzyki błonowe są nośnikami białek związanych ze specyficznymi strukturami cukrowymi (Costa i in. 2017), niewiele wiadomo natomiast o biologicznym znaczeniu ich glikozylacji. W poniższym rozdziale scharakteryzowano przebieg procesu glikozylacji oraz podsumowano wyniki badań dotyczących wpływu glikozylacji białek obecnych w różnych populacjach mikropęcherzyków błonowych na procesie ich sortowania, oddziaływanie z komórkami docelowymi oraz potencjału diagnostycznego tych glikanów.

## 2. Opis zagadnienia

Powstające w procesie glikozylacji glikoproteiny i proteoglikany mogą różnić się typem i miejscem utworzenia wiązania glikozydowego z polipeptydem oraz strukturą samego łańcucha cukrowego. Spośród ok. 200 znanych monosacharydów, zaledwie 8 powszechnie występuje w łańcuchach oligosacharydowych, a chemiczna różnorodność glikozylowanych białek wynika przede wszystkim z izomerii monosacharydów, anomeryczności i rodzaju utworzonego wiązania glikozydowego między monosacharydami, tworzenia rozgałęzień, a także z kowalencyjnymi modyfikacjami cukrów prostych m.in. fosforylacją, acetylacją czy przyłączeniem grup siarczanowych. Co istotne w większości reakcji biosyntezy glikoprotein nie biorą udziału wolne, czy ufosforylowane formy cukrów, lecz wykorzystywane są ich nukleotydowe pochodne np. UDP-*N*-acetyloglukozamina oraz GDP-mannoza, powstające w cytoplazmie z nukleotydów, takich jak urydynodifosforan (UDP) czy guanozynodifosforan (GDP).

Wytworzenie wiązania pomiędzy resztą cukrową a aminokwasem jest kluczowe dla biosyntezy łańcuchów oligosacharydowych w procesie glikozylacji – uruchamia ono złożoną serię potranslacyjnych, enzymatycznych reakcji, które prowadzą do syntezy ogromnej liczby glikoprotein i proteoglikanów o zróżnicowanych biologicznych funkcjach. Dotychczas zidentyfikowano 13 różnych monosacharydów (uwzględniając izomery) i 8 reszt aminokwasowych zdolnych do utworzenia 41 różnych wiązań między resztą cukrową a resztą aminokwasową. Na podstawie szczegółowej struktury wspomnianego wiązania, wyróżnia się kilka typów glikozylacji, spośród których za najlepiej zbadane uznaje się *N*-glikozylację i *O*-glikozylację.

W przypadku *N*-glikozylacji łańcuch oligosacharydowy, za pośrednictwem atomu węgla C1 cząsteczki *N*-acetyloglukozaminy, jest przyłączany wiązaniem *N*-glikozydowym do azotu grupy amidowej asparaginy w obrębie łańcucha polipeptydowego. Asparagina znajduje się w sekwencji Asn-X-Thr/Ser (Asn – asparagina, Thr – treonina, Ser – seryna), gdzie X jest dowolnym aminokwasem z wyjątkiem proliny, kwasu glutaminowego i kwasu asparaginowego. Pierwszy etap biosyntezy *N*-wiązanego glikoprotein nie wymaga obecności łańcuchów polipeptydowych, lecz odbywa się z wykorzystaniem związanego z błoną szorstkiego retikulum endoplazmatycznego (RER, ang. rough endoplasmic reticulum) lipidowego nośnika fosforanu dolicholu (Dol-P). Dol-P stanowi podstawę do syntezy prekursorowej jednostki oligosacharydowej związanej z nośnikiem lipidowym (LLO, ang. lipid-linked oligosaccharide), który następnie jest przenoszony na atom azotu grupy amidowej Asn docelowego białka.

Dolichol to jeden z najdłuższych, naturalnie występujących alkoholi, zawierający 17-20 jednostek izoprenowych (pięciowęglowych). W pierwszych reakcjach procesu *N*-glikozylacji ulega on fosforylacji do Dol-P przez kinazę dolicholową, przenoszącą resztę fosforanową z adenozyntrifosforanu (ATP) na dolichol. Reszty cukrowe są przyłączane do Dol-P najpierw od strony cytoplazmatycznej, a następnie w świetle RER. W wyniku kolejnych reakcji powstaje jednostka oligosacharydowa LLO, składająca się z dwóch reszt *N*-acetyloglukozaminy, dziewięciu

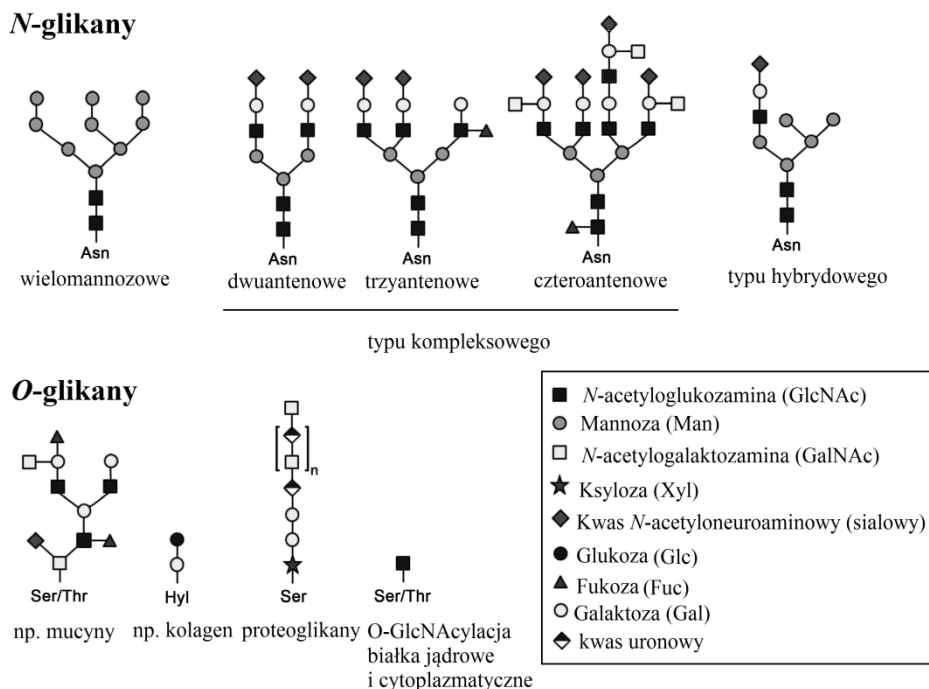
reszt mannozy i trzech reszt glukozy (GlcNAc<sub>2</sub>-Man<sub>9</sub>-Glc<sub>3</sub>). Łańcuch oligosacharydowy LLO jest następnie przenoszony w całości na nowosyntetyzowany polipeptyd związany z błoną RER. Tam przy udziale transferazy oligosacharydowo-białkowej, związanej z błoną wewnętrzną RER, wytwarzane jest wiązanie N-glikozydowe z udziałem atomu azotu grupy amidowej Asn łańcucha polipeptydowego.

Proces N-glikozytacji nie kończy się na przeniesieniu reszt cukrowych (GlcNAc<sub>2</sub>-Man<sub>9</sub>-Glc<sub>3</sub>) z LLO i związaniu ich z polipeptydem. Łańcuch oligosacharydowy N-wiązanych glikoprotein jest następnie modyfikowany w obrębie RER i aparatu Golgiego (AG), przez glikozydazy, które usuwają określone monosacharydy ze struktury cukrowca, i glikozylotransferazy – dodające wybrane reszty cukrowe do rozbudowywanej struktury. W wyniku późniejszych przekształceń wyjściowego łańcucha cukrowego powstają makrocząsteczki posiadające wspólny pentasacharydowy rdzeń (GlcNAc<sub>2</sub>-Man<sub>3</sub>), jednak odmienne pod względem struktury dalszej części łańcucha. Wspomniane modyfikacje pozwalają na wyróżnienie trzech klas N-wiązanych glikoprotein: o wysokiej zawartości mannozy, określanych też jako wielomannozowe, kompleksowych i hybrydowych. N-glikany typu kompleksowego posiadają zwykle terminalną resztę kwasu siałowego oraz charakterystyczne reszty N-acetyloglukozaminy i galaktozy, tworzące powtarzający się fragment N-acetylolaktozaminowy. Alternatywne zakończenie łańcucha mogą stanowić reszty galaktozy lub fukozy. Większość zawiera od 2 do 6 zewnętrznych rozgałęzień nazywanych antenami. Glikoproteiny bogate w mannozę oprócz rdzenia pentasacharydowego zawierają od 2 do 6 dodatkowych reszt mannozy, natomiast struktury typu hybrydowego posiadają cechy właściwe dla obu typów (Rys. 1) (Przybyło 1998; Schwarz i in. 2011).

W przebiegu procesu O-glikozytacji wiązanie glikozydowe tworzone jest pomiędzy atomem węgla C1 różnych reszt cukrowych, a funkcyjnymi grupami hydroksylowymi aminokwasów. W przeciwieństwie do N-glikanów, syntetyzowanych kotranslacyjnie (równoległe do procesu translacji) na lipidowym nośniku (Dol-P), synteza O-glikanów zachodzi wyłącznie potranslacyjnie i bezpośrednio na łańcuchu polipeptydowym. O-glikany nie posiadają jednej wspólnej struktury korowej, a różnice te są podstawą ich klasyfikacji. Najczęściej występujący rodzaj wiązania O-glikozydowego to połączenie N-acetylogalaktozaminy z seryną lub treoniną, typowy np. dla mucyn. Dla kolagenu charakterystyczne jest wiązanie O-glikozydowe pomiędzy resztą hydroksylizyny a resztą galaktozy. Trzecią grupę stanowią proteoglikany, w których strukturach glikozaminoglikany (polisacharydy zbudowane z powtarzających się jednostek dwucukrowych, w których jedna reszta to zawsze aminocukier, a druga to kwas uronowy) przyłączone są do reszty seryny w łańcuchu białkowym za pośrednictwem charakterystycznej sekwencji Gal-Gal-Xyl (Gal – galaktoza, Xyl – ksyloza), a wiązanie glikozydowe tworzą tu reszty seryny i ksylozy. Ostatni z poznanych typów, gdzie reszty N-acetyloglukozaminy przyłączone są do seryny i treoniny (tzw. O-GlcNAcyłacja), jest charakterystyczny dla białek cytoplazmatycznych i jądrowych. Za wyjątkiem ostatniej z wymienionych grup, łańcuchy oligosacharydowe większości O-glikanów są potranslacyjnie rozbudowywane i modyfikowane dzięki glikozylotransferazom i glikozydazom obecnym na błonach RER i AG. W przypadku białek, które nie wchodzą do retikulum endoplazmatycznego (np. białek jądrowych i cytoplazmatycznych posiadających tylko pojedynczą resztę GlcNAc) O-glikolacja może zachodzić również w cytoplazmie (Dutta i in. 2017).

Zarówno N-glikozyłowane jak i O-glikozyłowane białka mogą ulegać inkorporacji do różnych populacji mikropecherzyków błonowych – egzosomów, ektosomów, a także ciałek apoptotycznych. Ektosomy powstają z pączkujących do wewnątrz fragmentów błony wczesnych endosomów, przekształcanych w tzw. ciała wielopecherzykowe (MVB, ang. multivesicular bodies). Ciała pecherzykowe zawierające egzosomy ulegają fuzji z zewnętrzną błoną komórkową, co umożliwia uwolnienie pecherzyków do przestrzeni międzykomórkowej. Odmienne mechanizmy biogenezy w przypadku ektosomów związany jest z tworzeniem uwypukleń w zewnętrznej błonie komórkowej, a w przypadku ciałek apoptotycznych – z otoczeniem błoną komórkową całych fragmentów cytoplazmy, zawierających resztki chromatyny i funkcjonalne organella. Poza sposobem powstawania, głównym kryterium pozwalającym na klasyfikację poszczególnych typów mikropecherzyków błonowych jest ich wielkość. Średnica najmniejszych pecherzyków, tj. egzosomów, waha się w zakresie 30-100 nm. Bardziej heterogenną populację stanowią ektosomy

(0,1-1  $\mu\text{m}$ ), natomiast średnica największych ciałek apoptotycznych może wynosić nawet 5  $\mu\text{m}$  (Raposo i in. 2013; Wójtowicz i in. 2014).



**Ryc. 1.** Przykłady struktur cukrowych przyłączanych do białek w procesie N-glikozylacji i O-glikozylacji.

### 3. Przegląd literatury

Mikropęcherzyki błonowe izolowane z różnych płynów ustrojowych (m.in. krwi, moczu, płynu mózgowo-rdzeniowego) bądź kondycjonowanych pożywek są nośnikami znaczącej liczby glikoprotein, posiadających charakterystyczne struktury cukrowe. Pierwsze badania poświęcone temu zagadnieniu wykazały obecność kilku różnych glikoform białka prionowego PrP w egzosomach (Vella i in. 2007). Niedługo później, technologia mikromacierzy lektynowych (unieruchomionych na wielodołkowej płytce-nośniku białek roślinnych wiążących określone struktury cukrowe) pozwoliła porównać glikozylację eksosomów uwalnianych *in vitro* przez różne populacje limfocytów T i cząsteczek wirusa HIV-1. Zaobserwowane podobieństwa dotyczyły m.in. wzbogacenia łańcuchów cukrowych w struktury wielomannozowe i kompleksowe zawierające fukozę, kwas sialowy i jednostki N-acetylogalaktozaminylowe. Wyniki te pozwoliły na postawienie hipotezy, że profil glikozylacji cząsteczek HIV-1 jest zbliżony do glikozylacji eksosomów uwalnianych przed komórki układu odpornościowego, a ma służyć kamuflażowi i ucieczce wirusa przed rozpoznaniem go przez układ immunologiczny (Krishnamoorthy i in. 2009).

Coraz więcej badań potwierdza również wpływ glikozylacji na sortowanie białek do mikropęcherzyków. Zaobserwowano, że m.in. inkorporacja glikoproteiny EWI-2 do egzosomów uwalnianych przez komórki czerniaka zależy od stopnia jej N-glikozylacji, a dokładnie od liczby glikanów typu kompleksowego. Zastosowanie inhibitora N-glikozylacji bądź punktowe mutacje potencjalnych miejsc N-glikozylacji EWI-2 skutecznie hamowały sortowanie tego białka do mikropęcherzyków (Liang i in. 2014). Znaczenie glikanów typu kompleksowego potwierdziły kolejne badania z wykorzystaniem kifunenzyny, alkaloidu hamującego przekształcanie glikanów typu wielomannozowego w glikany typu kompleksowego, która spowodowała istotne zmiany w składzie egzosomów uwalnianych przez komórki raka jajnika (Gomes i in. 2015). Kolejny

potencjalny mechanizm sortowania białek do mikropęcherzyków opiera się na interakcjach glikoprotein z białkami z rodziny galektyn, zdolnych do wiązania  $\beta$ -galaktozydów, w tym jednostek *N*-acetylolaktozaminylowych. Badania na modelu mysim pozwoliły wykazać, że zawartość jednostek *N*-acetylolaktozaminylowych w egzosomach uwalnianych przez retikulocyty jest zależna od wewnątrzkomórkowego stężenia galektyny-5 (Barres i in. 2010). Zależny od glikozylacji mechanizm sortowania może występować również w przypadku proteoglikanów. Obecność cząsteczek siarczanu heparanu (glikozaminoglikanu) przyłączonych do transbłonowego białka – syndekanu warunkowała jego inkorporację do egzosomów uwalnianych *in vitro* przez komórki kilku typów nowotworów, co udowodniono później stosując heparanazę, enzymem degradującym siarczan heparanu (Thompson i in. 2013).

Przekazanie wybranych sygnałów przez mikropęcherzyki innym niesąsiadującym komórkom może zachodzić na drodze: oddziaływania ligand-receptor, fuzji mikropęcherzyka z błoną komórki docelowej lub jego endocytozie. Niezależnie od mechanizmu wiele glikoprotein i proteoglikanów obecnych na powierzchni mikropęcherzyków odgrywa istotną rolę podczas interakcji z komórką docelową. Przykładowo, łańcuchy siarczanu heparanu w proteoglikanach hamowały inkorporację mikropęcherzyków przez komórki glejaka wielopostaciowego (Christianson i in. 2013), komórki raka pęcherza moczowego (Franzen i in. 2014) oraz prawidłowe komórki gwieździste wątroby (Chen i in. 2016) hodowane w warunkach *in vitro*. W innych badaniach wykazano, że obecność galektyny-5 (również glikoproteiny) w egzosomach pochodzących z retikulocytów szczura jest konieczna do ich inkorporacji przez makrofagi (Barres i in. 2010). Co więcej, w przypadku białka błonowego związanego z lizosomami Lamp2b (ang. lysosome-associated membrane protein) stworzenie nowych potencjalnych miejsc *N*-glikozylacji z wykorzystaniem technik inżynierii genetycznej, spowodowało zwiększoną inkorporację Lamp2b-pozytywnych egzosomów przez komórki neuroblastomy (Hung i in. 2015).

Obecność mikropęcherzyków w większości płynów ustrojowych oraz fakt, że ich zawartość w znaczącym stopniu odzwierciedla skład uwalniających je komórek, czyni je również bogatym źródłem potencjalnych biomarkerów w wielu stanach chorobowych. Co więcej, również zmiany w profilu glikozylacji białek, charakterystyczne dla różnych schorzeń, są obserwowane w wyizolowanych populacjach mikropęcherzyków. W przypadku pacjentów z galaktozemią (genetycznie uwarunkowanym upośledzeniem przekształcania galaktozy, pochodzącej z laktozy, w glukozę) wyizolowana z moczu populacja egzosomów charakteryzowała się zmniejszoną ilością struktur wielomannozowych w stosunku do grupy kontrolnej (Staubach i in. 2012).

Zmiany w profilu glikozylacji białek są również charakterystyczne dla chorób nowotworowych, gdzie struktury cukrowe modulują m.in. zdolności migracyjne i adhezję komórek nowotworowych. Wykorzystanie macierzy lektynowych i chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas pozwoliło ustalić specyficzne wzory glikozylacji ektosomów uwalnianych przez komórki czerniaka skóry i raka okrężnicy. W obu przypadkach zaobserwowane wzbogacenie ektosomalnych glikoprotein w glikany typu wielomannozowego oraz kompleksowego, które to posiadały  $\alpha$ 2,6-wiązane kwasy sialowe (Batista i in. 2011; Gomes i in. 2015). *N*-glikozylacja białek egzosomalnych została zbadana m.in. z wykorzystaniem linii komórkowych raka jajnika, gdzie glikoproteiny obecne w egzosomach posiadały zwiększoną (w stosunku do prawidłowych komórek) ilość glikanów wielomannozowych i trzyantenowych glikanów typu kompleksowego z „przedzielającą” cząsteczką *N*-acetylglukozamininy. Co więcej, zwiększona ekspresja tych samych struktur jest charakterystyczna dla tkanek guza, co wskazuje na realną możliwość wykorzystania egzosomów w diagnostowaniu raka jajnika (Escrevante i in. 2013).

Glikozylacja wybranych białek transportowanych za pośrednictwem mikropęcherzyków może również modulować wywierany przez nie pronowotworowy efekt. Metaloproteinazy to enzymy proteolityczne odpowiedzialne za degradację białek macierzy zewnątrzkomórkowej i błon podstawnych, co promuje inwazję komórek nowotworowych. Wielokrotnie *N*-glikozylowane cząsteczki zewnątrzkomórkowego aktywatora metaloproteinaz (EMMPRIN, ang. extracellular matrix metalloproteinases inducer) zostały zidentyfikowane w egzosomach uwalnianych przez inwazyjne komórki raka piersi, a ich enzymatyczna deglikozylacja znacząco osłabiała migrację komórek nowotworowych wywołaną inkubacją z egzosomami (Menck i in. 2015). Innymi glikoproteinami,

które zostały dotychczas zidentyfikowane w mikropęcherzykach są integryny, rodzina białek adhezyjnych o kluczowym znaczeniu w adhezji i migracji komórek, a także transformujący (TGF- $\beta$ , ang. transforming growth factor) i epidermalny (EGF, ang. epidermal growth factor) czynniki wzrostu, których to mutacje w kodujących je genach są czynnikiem promującym progresję nowotworu (Costa i in. 2017). Znaczenie glikozylacji integryn, TGF- $\beta$ , EGF oraz pozostałych glikoprotein obecnych w mikropęcherzykach, choć nie zostało jeszcze zbadane, powinno znaleźć się w kręgu zainteresowań grup badawczych zajmujących się biologią mikropęcherzyków błonowych.

#### 4. Podsumowanie i wnioski

Od ponad dekady kolejne badania dostarczają dowodów na istotną rolę glikozylacji białek w biologii mikropęcherzyków błonowych, Obecność charakterystycznych struktur cukrowych na powierzchni białek może stanowić jeden z mechanizmów umożliwiających sortowanie wybranych glikoprotein do mikropęcherzyków, a także umożliwiać interakcje mikropęcherzyków z komórkami docelowymi. Co więcej, możliwość izolacji mikropęcherzyków z większości płynów ustrojowych wskazuje na ich istotny potencjał w zakresie diagnostyki różnych stanów chorobowych, zwłaszcza chorób nowotworowych. Obecność wielu glikoprotein stosowanych obecnie w diagnostyce klinicznej została już potwierdzona w różnych populacjach mikropęcherzyków. Wśród nich warto wyróżnić mucynę 1 (MUC1) – marker nowotworów nabłonkowych, w tym raka piersi, antygen CA19-9 – marker raka trzustki, antygen karcinoembrionalny (CEA, ang. Carcinoembryonic antygen) – marker raka okrężnicy oraz markery nowotworu jajnika: antygeny CA125, CD24 i cząsteczkę adhezyjną komórek nabłonkowych (EpCAM, ang. epithelial cell adhesion molecule) (Costa i in. 2017). Określenie czy wspomniane bądź inne glikoproteiny charakterystyczne dla różnych stanów patologicznych ulegają wzbogaceniu w mikropęcherzykach błonowych izolowanych z płynów ustrojowych powinno stać się przedmiotem szeroko zakrojonych badań, prowadzących w efekcie do opracowania nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych.

**Finansowanie:** Powstanie niniejszej pracy zostało sfinansowane ze środków Fundacji Studentów i Absolwentów UJ „Bratniak” oraz Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (K/DCS/004659).



#### 5. Literatura

- Barres C, Blanc L, Bette-Bobillo P i in. (2010) Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood*. 115: 696–705.
- Batista BS, Eng WS, Pilobello KT i in. (2011) Identification of a conserved glycan signature for microvesicles. *J Proteome Res*. 10: 4624–4633.
- Chen L, Brigstock DR (2016) Integrins and heparan sulfate proteoglycans on hepatic stellate cells (HSC) are novel receptors for HSC-derived exosomes. *FEBS Lett*. 590: 4263–4274.
- Christianson HC, Svensson KJ, van Kuppevelt TH i in. (2013) Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci U. S. A*. 110: 17380–17385.
- Costa J (2017) Glycoconjugates from extracellular vesicles: Structures, functions and emerging potential as cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta*. 1868(1): 157–166.
- Dutta D, Mandal C, Mandal C (2017) Unusual glycosylation of proteins: Beyond the universal sequon and other amino acids. *Biochim Biophys Acta*. 1861(12): 3096–3108.
- Escrevente C, Grammel N, Kandzia S (2013) Sialoglycoproteins and N-glycans from secreted exosomes of ovarian carcinoma cells. *PLoS One* 8: e78631.

- Franzen CA, Simms PE, Van Huis AF i in. (2014) Characterization of uptake and internalization of exosomes by bladder cancer cells. *Biomed Res Int.* 2014: 619829.
- Gomes J, Gomes-Alves P, Carvalho SB i in. (2015) Extracellular vesicles from ovarian carcinoma cells display specific glycosignatures. *Biomol Ther.* 5: 1741–1761.
- Hung ME, Leonard JN (2015) Stabilization of exosome-targeting peptides via engineered glycosylation. *J Biol Chem.* 290: 8166–8172.
- Krishnamoorthy L, Bess JW, Preston AB i in. (2009) HIV-1 and microvesicles from T cells share a common glycome, arguing for a common origin. *Nat Chem Biol.* 5: 244–250.
- Liang Y, Eng WS, Colquhoun DR i in. (2014) Complex N-linked glycans serve as a determinant for exosome/microvesicle cargo recruitment. *J Biol Chem.* 289: 32526–32537.
- Menck K, Scharf C, Bleckmann A i in. (2015) Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN. *J Mol Cell Biol.* 7(2): 143–153.
- Ohtsubo K, Marth JD (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell.* 126(5): 855–867.
- Przybyło M (1998) Budowa i synteza łańcuchów cukrowych glikoprotein. *Kosmos.* 1(238): 68-92.
- Raposo G, Stoorvogel W (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 200: 373–383.
- Staubach S, Schadewaldt P, Wendel U i in. (2012) Differential glycomics of epithelial membrane glycoproteins from urinary exovesicles reveals shifts toward complex-type N-glycosylation in classical galactosemia. *J Proteome Res.* 11:906–916.
- Schwarz F., Aeberli M (2011) Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation. *Curr Opin Struc Biol.* 21(5): 576–582.
- Thompson CA, Purushothaman A, Ramani VC i in. (2013) Heparanase regulates secretion, composition, and function of tumor cell-derived exosomes. *J Biol Chem.* 288: 10093–10099.
- Vella LJ, Sharples RA, Lawson VA i in. (2007) Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J Pathol.* 211: 582–590.
- Wójtowicz A, Baj-Krzyworzeka M, Baran J (2014) Characterization and biological role of extracellular vesicles. *Postepy Hig Med Dosw.* 68: 1421–1432.

## **18. Genetyczne uwarunkowania zdolności matematycznych**

Genetic determinants of mathematical abilities

Julia Eliza Rodkiewicz, Małgorzata Gut

Wydział Humanistyczny, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Opiekun naukowy: dr Małgorzata Gut

Rodkiewicz Julia: rodkiewiczjulia@gmail.com

Słowa kluczowe: dyskalkulia, badania bliźniąt, zdolności matematyczne

### **Streszczenie**

Z licznych badań nad genetycznymi uwarunkowaniami zachowania wiadomo, że także rozwój zdolności poznawczych (obecny w normie lub w patologii) jest determinowany wpływem czynników biologicznych i środowiskowych. To ich wzajemna gra decyduje o kształtowaniu się poszczególnych umiejętności na określonym poziomie. Jednakże czynniki środowiskowe (dotyczące zarówno tzw. środowiska wspólnego i specyficznego dla jednostki) są konieczne, ale nigdy wystarczające w rozwoju poznawczym, ponieważ punktem wyjścia zawsze jest baza biologiczna. Są to determinanty genetyczne oraz neuronalne podłoże badanych umiejętności (prawidłowy rozwój struktur kluczowych dla tych zdolności). Artykuł koncentruje się na znaczeniu determinant genetycznych i stanowi przegląd wybranych wyników badań nad tym zagadnieniem w odniesieniu do tak szczególnych kompetencji poznawczych, jak te składające się na umiejętności matematyczne.

Kiedy w rozwoju człowieka pojawia się umiejętność przetwarzania liczb? Czy jest to zdolność, z którą przychodzimy na świat, czy raczej musimy ją opanować w wyniku wpływów otoczenia i praktyk edukacyjnych? Badania jednoznacznie pokazują, że w błędzie jest każdy, kto sądzi, iż umiejętności matematyczne są czymś, czego uczymy się dopiero rozpoczynając edukację przedszkolną czy wczesnoszkolną. Pewne podstawowe zdolności w zakresie przetwarzania liczb są bowiem wrodzone, a przejawy ich istnienia można zaobserwować już w okresie niemowlęcym (de Hevia i Spelke 2010; Butterworth 2005). Są to np. umiejętności szacowania liczebności oraz szybkiego określania liczby elementów w małych zbiorach (tzw. subitacja). Za biologicznym uwarunkowaniem tych zdolności poznawczych przemawia także fakt, że pewne kompetencje numeryczne można przypisać również gatunkom innym niż człowiek (przeł. Trojan 2013). Badania laboratoryjne i obserwacje licznych gatunków zwierząt w naturze pokazują z jednej strony, że potrafią one bardzo łatwo i szybko uczyć rozpoznawać czy porównywać liczebności, ale też z drugiej strony, że umiejętność przeliczania czy szacowania jest naturalną zdolnością niezbędną zwierzętom do efektywnego funkcjonowania w ich środowisku. Ponadto, liczne wyniki badań klinicznych i eksperymentalnych nie pozostawiają wątpliwości co do tego, że przetwarzanie liczb, jak i deficyty w tym zakresie, mają swoje neuronalne podłoże. Obszarami kluczowymi w operowaniu materiałem liczbowym i mentalnymi reprezentacjami liczb są: kora ciemieniowa (szczególnie tzn. bruzda śródcieniowa) będąca podstawą dla bazowych kompetencji numerycznych, oraz obszary czołowe odgrywające istotną rolę w operacjach bardziej złożonych, koniecznych np. przy wykonywaniu działań arytmetycznych (np. Dehaene i in. 2004; Molko i in. 2003). Nieprawidłowości rozwojowe w obrębie kory ciemieniowej skutkują więc zaburzeniami w zakresie przetwarzania materiału liczbowego, definiowanymi jako dyskalkulia, zaś uszkodzenia tych obszarów korowych prowadzą do utraty umiejętności liczenia, nazywanej akalkulią (np. Butterworth i in. 2011). Co zatem determinuje określony poziom kompetencji matematycznych? Czynniki biologiczne czy środowiskowe? Obecnie nikt nie kwestionuje znaczenia wpływów otoczenia, czyli takich oddziaływań jak wychowanie, edukacja (z jej metodami i postawą nauczycieli), specyficzny trening umiejętności, a nawet stereotypy. Czynniki te jednak nie byłyby wystarczające w kształtowaniu się umiejętności matematycznych, gdyby nie udział determinant biologicznych, takich jak uwarunkowania genetyczne i neuronalna baza zdolności do operowania umysłowymi reprezentacjami liczb (von Aster i Shalev 2007). Jak się wydaje oddziaływanie środowiska nakłada się na wpływy biologiczne i wspólnie



decydują one o określonym rozwoju umiejętności poznawczych, w tym również tych związanych z matematyką.

### 1. Metody badania genetycznych uwarunkowań zachowania

W jaki sposób naukowcy badają wpływ genów na zachowanie lub procesy poznawcze? Po pierwsze należy skupić się na podobieństwach lub różnicach badanej cechy w obrębie gatunku. Istnieją trzy główne metody badań nad uwarunkowaniami genetycznymi, a mianowicie są to studia rodzinne, metoda adopcyjna oraz badania bliźniąt. Te pierwsze skupiają się na doszukiwaniu się stałych cech występujących w kilku pokoleniach tych samych rodzin. Metoda adopcyjna to badania z udziałem dzieci niewychowujących się z biologicznymi rodzicami. Pozwala to określić stopień wpływu czynników środowiskowych na daną cechę, oddzielając go od wpływu genów. Ostatni nurt badań polega na wskazywaniu podobieństw i różnic wewnątrz par bliźniąt monozygotycznych (MZ, bliźniąt jednojajowych) oraz dzygotycznych (DZ, bliźniąt dwujajowych). Bliźnięta MZ są często nazywane identycznymi; rozwijają się z tej samej zapłodnionej komórki jajowej i mają identyczny zestaw genów. Bliźnięta DZ rozwijają się z dwóch różnych komórek jajowych i ich zestawy genów są podobne do siebie w około 50%, a więc w takim samym stopniu jak to jest w przypadku rodzeństwa niebliźniaczego. Ze względu na ten fakt, próba badawcza w przypadku badań z udziałem bliźniąt dwujajowych uważana jest również za próbę reprezentatywną dla populacji niebliźniaczej. Wpływ czynników środowiskowych mających znaczenie dla badanej cechy jest taki sam w przypadku obu rodzajów bliźniąt, ze względu na założenie o tożsamości środowisk, w których się wychowują.

Istnieją jeszcze nurty łączące poszczególne rodzaje metod badań nad uwarunkowaniami genetycznymi. Na przykład metoda łącząca badania z dziećmi adoptowanymi oraz bliźniętami pozwala na sprawdzanie wpływu środowiska na rodzeństwo bliźniąt MZ, które zostało rozdzielone po urodzeniu i wychowywane w innych środowiskach. Jeżeli geny nie odegrały istotnej roli w kształtowaniu indywidualnych różnic w zachowaniu (poszczególnych cech) lub w poziomie wybranej zdolności poznawczej, to poprzez wpływ dwóch różnych środowisk, rodzeństwo to będzie podobne do siebie maksymalnie w takim stopniu jak bliźnięta DZ. To podejście badawcze jest szczególnie, jednak bardzo trudne w realizacji ze względu na bardzo rzadkie przypadki rozdzielania bliźniąt tuż po urodzeniu.

### 2. Geny, środowisko wspólne i specyficzne

Badania nad wpływem genów i środowiska na poszczególne zdolności mają bardzo długą historię. W 1869 roku Francis Galton (za: Oniszczenko, Dragan, 2008) postawił ważne w tej dziedzinie pytanie: „natura czy wychowanie?”. Około 100 lat później wyniki wielu badań wykazały, że około 50% ogólnych zdolności definiuje nasz genotyp, a pozostałą część zmienności - inne czynniki, takie jak środowisko, w którym się wychowujemy, edukacja, wyznanie i inne (Bergen i in. 2007; Deary i in. 2006; Plomin i Petrill 1997; Plomin i Spinath 2004; za: Oniszczenko i Dragan 2008).

Obie kategorie czynników są istotne dla prawidłowego rozwoju zdolności poznawczych, inteligencji, zachowania, a także powstawania indywidualnych różnic w ich poziomie pomiędzy osobnikami. Przypuszcza się również, że ta sama pula genów może tłumaczyć zarówno deficyt jak i prawidłowy rozwój danej cechy. Ponadto, to jaki wpływ na daną cechę mają geny lub środowisko, może ulegać ciągłym zmianom na przestrzeni życia człowieka.

A zatem, oprócz czynników genetycznych wpływających na nasze zachowanie i zdolności poznawcze, często równie istotną rolę w powstawaniu indywidualnych różnic w ich poziomach odgrywają czynniki środowiskowe. Genetycy zajmujący się badaniem podstaw zachowania i procesów poznawczych wyróżniają dwa typy wpływów środowiskowych. Pierwszym z nich jest *środowisko wspólne*, które odnosi się do ogólnego charakteru środowiska rodziny (zarówno biologicznej jak i adopcyjnej). Na te cechy składa się między innymi sytuacja materialna rodziny, tradycje, wyznanie czy nawet wzajemny stosunek członków rodziny. *Specyficzne środowisko* odnosi się natomiast do rodzinnych jak i zewnątrz-rodzinnych czynników różnicujących jej członków. Pojęcie to utożsamiane jest z *historią życia* danej jednostki, a na jej ukształtowanie ma wpływ wiele czynników odróżniających ją od rodzeństwa czy rodziców. Takim znaczącym czynnikiem może być na przykład kolejność urodzin, ze względu na to, że pierwsze dziecko w rodzinie zazwyczaj spotyka się z innymi doświadczeniami niż kolejne dzieci oraz dziecko ostatnie (najmłodsze). Innymi

czynnikami mającymi wpływ na kształtowanie specyficznego środowiska są także zdarzenia losowe, takie jak choroby czy urazy, oraz interakcje z innymi grupami rówieśniczymi lub nauczycielami i ich wpływ na jednostkę. W przypadku osób dorosłych istotna jest tutaj również indywidualna sytuacja materialna i warunki psychologiczne w jego późniejszym okresie życia. Genetycy zachowania nie zakładają determinizmu genetycznego, ale wręcz przeciwnie: podkreślają istotną rolę czynników środowiskowych, przypisując im tę część zmienności, która nie została wyjaśniona znaczącym wpływem genów.

### 3. Znaczenie czynników biologicznych i środowiskowych w kształtowaniu zdolności poznawczych

Badania metodą studiów adopcyjnych z udziałem 241 rodzin (Deater-Deckard i Petrill 2004) wykazały, że wspólne środowisko nie ma istotnego wpływu na zmienność w zakresie ogólnych zdolności w okresie wczesnoszkolnym. Świadczy to o tym, że na poziom zdolności dzieci w tym wieku wpływ mają w większości czynniki genetyczne oraz specyficzne środowisko. Współczynnik korelacji między poziomem badanych zdolności u matek i u ich adoptowanych dzieci wynosił zaledwie 0,03, natomiast ten obliczony dla matek i ich biologicznych dzieci - 0,23. Specyficzne środowisko ujawnia swój wpływ zarówno na stałość jak i zmienność poziomu cech, podczas gdy rola genów jest istotna tylko w ich stałości. Wspólne środowisko ma z kolei bardziej znaczący wpływ na poziom ogólnych zdolności w przypadku dzieci w starszej grupie wiekowej, co naukowcy tłumaczą silniejszym oddziaływaniem edukacji, ze względu na rozpoczęcie bardziej zaawansowanej nauki w szkole. W przypadku najmłodszych dzieci (tych, które nie zaczęły jeszcze edukacji szkolnej) zróżnicowanie ich zdolności jest bardziej zależne od wspólnego środowiska, aczkolwiek wpływ czynników genetycznych również jest zauważalny, jednak częściej u chłopców niż u dziewczynek. W badaniach Read i współpracowników (2006) wyniki pokazują również wyższy poziom odziedziczalności pewnych cech u dorosłych mężczyzn, w porównaniu z kobietami. Badana zmienność w poziomie poszczególnych zdolności wyjaśniana była przez geny w 34% w zadaniach związanych z zapamiętywaniem obrazków i aż do 62% w zadaniach na porównywanie cyfr w formacie symbolicznym. Badacze zaobserwowali dodatkowo, że ogólne funkcjonowanie poznawcze w przypadku obu płci jest jednakowo zależne od wpływu środowiska, ponieważ różnice międzypłciowe w poziomie dziedziczenia tych zdolności nie były znaczące.

W badaniach Knopik i DeFries'a (1999) zaobserwowano interesującą, zależną od czynników genetycznych, korelację pomiędzy sprawnością w czytaniu i zdolnościami w zakresie wykonywania zadań matematycznych. Przebadanych zostało aż 526 par bliźniąt jedнопłciowych z aleksją (zaburzenie polegające na utracie umiejętności czytania) oraz 355 par bliźniąt bez deficytu (stanowiących grupę kontrolną) w wieku od 8 do 20 lat. Badacze wykazali, że 81% wariacji w zakresie sprawności w czytaniu w grupie z aleksją jest wyjaśnione odziedziczalnością, zaś w grupie kontrolnej jest to 69%. W tym samym badaniu sprawdzana była również odziedziczalność w poziomie wykonania testów matematycznych. W grupie z deficytem zdolności czytania 88% wariacji wyjaśniała odziedziczalność, a grupie kontrolnej – 67%. W grupie z aleksją odnotowano brak wpływu wspólnego środowiska w wariacji wyników z obydwu testów, natomiast w grupie kontrolnej wykazano jego wpływ na poziomie 13% wariacji w przypadku testu czytania i 21% - w teście matematycznym. Jednocześnie, udział specyficznego środowiska był istotny zarówno w grupie z deficytem jak i w kontrolnej na poziomie 18% wariacji w teście czytania oraz kolejno 11 i 12% zmienności w przypadku testu matematycznego. W grupie z aleksją aż 83% tej zmienności zostało wyjaśnione czynnikami genetycznymi, podczas gdy w grupie kontrolnej jedynie 58%. Na tej podstawie badacze doszli do wniosku, że czytanie i zdolności matematyczne mogą mieć wspólne podłoże genetyczne jak i środowiskowe. Wyniki ujawniły również, że zdolności matematyczne są w większym stopniu uwarunkowane genetycznie, zaś czynniki środowiskowe mogą wpłynąć na ich poziom głównie w wyniku oddziaływania specyficznego środowiska.

Związki te potwierdzono niedługo później w badaniu sprawdzającym zależność genetyczną pomiędzy poziomem wykonywania testów matematycznych i czytania oraz poziomem wykonywania testów matematycznych i inteligencji ogólnej (Kovas i in., 2005). Badanie zostało przeprowadzone z udziałem 7-letnich dzieci. Współczynniki korelacji wynosiły kolejno 0,74 i 0,67. Korelacja

wspólnego środowiska dla obydwu testów wynosiła 0,74 i 0,21, natomiast korelacje dla specyficznego środowiska były nieco niższe - 0,39 i 0,11. Zaobserwowano istotny wpływ czynników genetycznych, który wyjaśniał aż 76% korelacji między wynikami obserwowanymi w testach zdolności matematycznych i czytania oraz 83% współzależności między wynikami z testów matematycznych i ogólnym poziomem inteligencji. Wyniki te potwierdzają wcześniej przyjmowaną hipotezę o tym samym podłożu genetycznym dla różnic indywidualnych w czytaniu, zdolnościach matematycznych i ogólnych. Należy jednak podkreślić, że fakt ten nie wyklucza istnienia poszczególnych, specyficznych genów dla każdej z tych umiejętności.

Beaujean (2005) na podstawie meta-analizy dowiódł, że zależna od czynników genetycznych jest również szybkość procesów umysłowych. Poziom zgodności genetycznej wzrasta jednak wraz ze stopniem złożoności zadania. W przypadku zadań prostych, sprawdzających podstawowe kompetencje, geny wyjaśniają 30% wariacji wyników, podczas gdy w przypadku zadań bardziej złożonych jest to już 52%. Autor wnioskuje na tej podstawie, że trudniejsze zadania związane są z większym udziałem szeregu procesów neurofizjologicznych, które stanowią podstawę przetwarzania informacji, a te są w większym stopniu uwarunkowane genetycznie.

#### 4. Genetyczne uwarunkowanie deficytów w zakresie umiejętności matematycznych

W innych badaniach (Oliver i in., 2004) wykazano również, że zarówno prawidłowy poziom zdolności matematycznych jak i deficyty w tym zakresie w przypadku dzieci 7-letnich mogą być wyjaśniane wpływem genetycznym, kolejno na poziomie 66 i 65%. Shalev i współpracownicy (2001, za: Pappas i Drigas 2015) wykazali z kolei, że jeśli dziecko zmaga się z dyskalkulią to w przypadku poprzednich pokoleń jego rodziny również występuje/występowało to zaburzenie. Przebadano 39 dzieci z dyskalkulią oraz członków ich rodzin i wykazano, że 66% matek, 53% rodzeństwa i 44% dziadków również cierpiało z powodu dyskalkulii. Z badań przeprowadzonych z udziałem bliźniąt zarówno jednojajowych jak i dwujajowych (Wilcutt i in. 2010) wynika, że jeśli u jednego z pary zdiagnozowano deficyt w zakresie zdolności matematycznych, to prawdopodobieństwo wystąpienia dyskalkulii u drugiego z nich wynosi 70% w przypadku bliźniąt MZ i 50% w przypadku bliźniąt DZ, czyli porównywalnie jak w przypadku rodzeństwa niebliźniaczego.

W innych badaniach (Pinel i Dehaene 2013) badanie grupy bliźniąt MZ i DZ wykazało znaczący związek pomiędzy zgodnością genetyczną i poziomem aktywacji określonych obszarów w mózgu w trakcie wykonywania zadań arytmetycznych. Większe podobieństwo w poziomie aktywacji poszczególnych obszarów zaobserwowano jednak u bliźniąt jednojajowych. Udział wspólnego środowiska stwierdzono natomiast w lateralizacji aktywacji w obrębie bruzdy śródciemieniowej, która jest strukturą kluczową dla przetwarzania materiału liczbowego. Dane dotyczące udziału genetycznych i środowiskowych czynników w rozwoju zdolności matematycznych pokazują, w jaki sposób geny i edukacja wpływają na rozwój sieci neuronalnych zawiadujących przetwarzaniem liczb.

#### 5. Podsumowanie

Powyższy przegląd badań pokazuje w jakim stopniu różnice w zakresie umiejętności poznawczych, w tym matematycznych, są uwarunkowane genetycznie. Wiele badań wskazuje jednak również na istotne wpływy wspólnego, ale i specyficznego środowiska. Prawidłowy rozwój jak i deficyty w poziomie tych zdolności, mogą być tak samo zdeterminowane genami jak i czynnikami środowiskowymi. W związku z tym ignorowanie w badaniach i codziennej praktyce psychologicznej czy edukacyjnej którejkolwiek z tych kategorii czynników wydaje się być błędem. Na tej podstawie możemy wysunąć wniosek, że na kształtowanie się naszych umiejętności matematycznych oprócz genów (czy innych czynników biologicznych, np. tych determinujących rozwój mózgu) istotny wpływ mają też czynniki inne niż biologiczne. Mogą to być oddziaływania związane z edukacją szkolną (metodami nauczania, materiałami dydaktycznymi i kompetencjami nauczycieli), wpływem środowiska szkolnego i rodzinnego, status socjoekonomiczny, treningi poznawcze (szczególnie te wspierane komputerowo, jak gry edukacyjne), a także każda inna styczność z materiałem liczbowym jak operowanie liczbami w sytuacjach znanych nam z codziennego doświadczenia (np. przeliczanie pieniędzy przy kasie, podczas obliczania wielkości promocji cenowych lub wielkości podatku, określanie upływu czasu, porównywanie wymiarów obiektów i przeliczanie jednostek, czy

przetwarzanie proporcji). Jednakże, mimo powszechnego oddziaływania tych czynników i ich różnorodności, nie wyznaczają one właściwego poziomu umiejętności matematycznych bez zapewnienia bazy biologicznej determinującej podstawy tych zdolności.

## **6. Literatura**

- Beaujean A (2005) Heritability of cognitive abilities as measured by mental chronometric tasks: A meta-analysis, *Intelligence*, 33: 187–201.
- Butterworth B (2005) The development of arithmetical abilities. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 46(1): 3-18.
- Deater-Deckard K, Petrill S (2004) Parent–child dyadic mutuality and child behavior problems: an investigation of gene–environment processes, *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 45:6: 1171–1179
- Dehaene S, Molko N, Cohen L et al. (2004) Arithmetic and the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 14: 218-224
- de Hevia MD, Spelke ES (2010) Number-space mapping in human infants. *Psychological Science*, 21: 653–660.
- Kovas Y, Harlaar N, Petrill S et al. (2005) ‘Generalist genes’ and mathematics in 7-year-old twins, *Intelligence*, 33: 473 – 489
- Knopik VS, DeFries JC (1999) Etiology of covariation between reading and mathematics performance: a twin study, *Twin Research*, 2: 226–234
- Molko N, Cachia A, Riviere D et al. (2003) Functional and structural alterations of the intraparietal sulcus in a developmental dyscalculia of genetic origin. *Neuron*, 40: 847-858.
- Oliver B, Harlaar N, Hayiou-Thomas M et al. (2004) A twin study of teacher-reported mathematics performance and low performance in 7-year-olds, *Journal of Educational Psychology*, 96: 504–517
- Oniszczenko W, Dragan W (2008) Genetyka zachowania w psychologii i psychiatrii, 13-15: 49-58
- Pappas M, Drigas A (2015) ICT Based Screening Tools and Etiology of Dyscalculia, *Journal of Experimental Psychology*, 5(3):61-66
- Pinel P, Dehaene S (2013) Genetic and environmental contributions to brain activation during calculation, *NeuroImage*, 81: 306-316
- Read S, Vogler G, Pedersen N et al. (2006) Stability and change in genetic and environmental components of personality in old age. *Personality and Individual Differences*, 40: 1637–1647
- Trojan M (2013), *Na tropie zwierzęcego umysłu*. Scholar, Warszawa
- Willcutt E, Pennington B, Duncan L (2010) Understanding the complex etiologies of developmental disorders: behavioral and molecular genetic approaches, *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, 31(7): 533-544
- Vasta R, Haith M, Miller S (1992) *Child Psychology. The Modern Science*, 118-125
- von Aster MG, Shalev RS (2007) Number development and developmental dyscalculia. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 49(11): 868-873

## **19. Różnice w poziomie zdolności matematycznych w parach bliźniąt jedno- i dwujajowych**

The differences in mathematical abilities between twins

Rodkiewicz Julia<sup>(1)</sup>, Gut Małgorzata<sup>(1)</sup>, Matulewski Jacek<sup>(2,3)</sup>, Goraczewski Łukasz<sup>(4)</sup>, Mańkowska Katarzyna<sup>(1)</sup>, Ciechalska Dominika<sup>(1)</sup>, Mielewczyk Aleksandra<sup>(1)</sup>, Witkowska Natalia<sup>(1)</sup>, Duch Włodzisław<sup>(2,3)</sup>

<sup>(1)</sup>Wydział Humanistyczny, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

<sup>(2)</sup>Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki UMK, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

<sup>(3)</sup>Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

<sup>(4)</sup>Neurodio Sp. z o. o.

Opiekun naukowy: dr Małgorzata Gut

Rodkiewicz Julia: rodkiewiczjulia@gmail.com

Słowa Kluczowe: genetyka zachowania, matematyka, zmysł numeryczny, oś liczbowa

### **Streszczenie**

Zdolności matematyczne jak i deficyty w ich zakresie są częściowo uwarunkowane genetycznie. W badaniu opisanym w niniejszym artykule podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, w jakim stopniu geny warunkują poziom podstawowych umiejętności u zdrowych dzieci. W tym celu przeanalizowano różnice w ich zakresie w 2 parach bliźniąt jednojajowych i w 3 parach bliźniąt dwujajowych. Badanymi byli uczniowie klas 1-3 szkoły podstawowej. Do badania użyto testu komputerowego Prokalkulia 6-9, który pozwala na ocenę takich umiejętności jak porównywanie liczb przedstawionych w różnych formatach oraz szacowanie miejsca liczby na osi. Dzieci w parach bliźniąt porównano też pod względem wyników w teście inteligencji WISC-R oraz pod kątem oceny ich umiejętności matematycznych dokonanej przez ich nauczycieli. Wyniki wskazują na różnice między bliźniętami w poszczególnych parach, w szczególności w przypadku bliźniąt dwujajowych. Bliźnięta różnią się czasem reakcji w zadaniach polegających na porównywaniu liczb lub precyzją w określaniu miejsca liczby na osi. Wyniki sugerują więc, że poza determinantą genetyczną równie istotny jest wpływ czynników zewnętrznych, innych niż biologiczne.

### **1. Wstęp**

Jedną z najpopularniejszych metod badania genetycznych uwarunkowań zdolności poznawczych jest badanie bliźniąt. Metoda ta polega na obserwacji podobieństw oraz różnic w parach bliźniąt monozygotycznych jak i dzygotycznych. Bliźnięta monozygotyczne (MZ) są nazywane również bliźniętami jednojajowymi, ponieważ rozwijają się z jednej zapłodnionej komórki jajowej, są tej samej płci oraz mają identyczny zestaw genów. Bliźnięta dzygotyczne (DZ), które potocznie nazywamy dwujajowymi, rozwijają się natomiast z dwóch odrębnych zapłodnionych komórek jajowych, a ich geny są takie same maksymalnie w 50%, a więc w takim samym stopniu jak w przypadku rodzeństwa niebliźniaczego. Zgodnie z założeniami tej metody badawczej, każda różnica w zachowaniu bliźniąt monozygotycznych powinna wynikać z wpływu środowiska. Inne założenie głosi, że wpływ środowiskowy mający znaczenie dla badanej cechy jest taki sam zarówno dla bliźniąt MZ jak i DZ.

Wyniki wielu badań dowodzą, że 50% ogólnych zdolności człowieka uwarunkowane jest czynnikami zewnętrznymi, zaś pozostałą część definiują czynniki genetyczne (przełg. Oniszczenko i Dragan 2008). A więc oprócz genów, równie istotnym czynnikiem wpływającym na zdolności poznawcze jest środowisko, w którym wychowuje się rodzeństwo. W kontekście badań nad uwarunkowaniem tych zdolności, można wyróżnić środowisko wspólne jak i specyficzne. Środowisko wspólne odnosi się do ogółu standardów życia rodziny, czyli cech takich jak ich sytuacja finansowa, wyznanie, tradycje, a także wzajemne relacje pomiędzy jej członkami. Wszystkie

czynniki, które odróżniają jednego członka rodziny od pozostałych składają się z kolei na specyficzne środowisko życia. Mowa tutaj o poszczególnych czynnikach zewnętrznych (takich jak na przykład zdarzenia losowe- uraz/choroba lub interakcje z innym środowiskiem niż rodzinne, np. znajomi w szkole, nauczyciele), które miały znaczący wpływ na jego rozwój, a w konsekwencji zarówno zachowania jak i zdolności poznawczych.

W prawidłowym rozwoju zdolności poznawczych istotne znaczenie mają zarówno czynniki genetyczne jak i środowiskowe. Odpowiadają one także za powstawanie indywidualnych różnic pomiędzy ludźmi, a na przestrzeni życia stopień wpływu czynników zewnętrznych na pojedynczą cechę może się zmieniać. Przyjęto również, że jedna pula genów może definiować prawidłowe kształtowanie się cechy, jak i deficyty w zakresie jej rozwoju.

Interesujące badania w zakresie deficytów funkcji poznawczych przeprowadziła Shalev i współpracownicy (2001), którzy określili stopień genetycznego uwarunkowania dyskalkulii rozwojowej. Jest to specyficzne zaburzenie, charakteryzujące się problemami w zakresie przetwarzania materiału numerycznego przy jednoczesnym prawidłowym ilorazie inteligencji (American Psychiatric Association 2013). Dyskalkulicy przejawiają trudności w przetwarzaniu mentalnych reprezentacji liczb, co w życiu codziennym przekłada się na problemy z szacowaniem, porównywaniem wielkości czy wykonywaniem nawet prostych operacji arytmetycznych (Butterworth 2010; Košč, 1982). Badania Shalev i współpracowników wykazały, że gdy u dziecka zdiagnozuję się dyskalkulię to deficyt ten na pewno występował również w poprzednich pokoleniach jego rodziny. Z badań bliźniąt (Wilcutt i in. 2010) wynika, że gdy jedno z bliźniąt MZ przejawia dyskalkulię, prawdopodobieństwo jej wystąpienia u drugiego z pary jest równe nawet 70%. W przypadku bliźniąt DZ, prawdopodobieństwo wystąpienia dyskalkulii u drugiego z rodzeństwa wynosi 50%. Na istotne znaczenie czynników biologicznych w kształtowaniu się umiejętności matematycznych (lub deficytów w ich zakresie) wskazują również wyniki licznych badań nad ich neuronalnym podłożem (Kucian i von Aster 2015; Dehaene i in. 2004).

Celem opisanych poniżej badań było porównanie poziomu zdolności matematycznych w parach bliźniąt jedno- i dwujajowych w wieku wczesnoszkolnym. Ze względu na fakt, iż trudności w matematyce są częściowo uwarunkowane genetycznie, podjęto próbę sprawdzania, czy geny definiują nie tylko deficyt w tym zakresie (co wykazały wspomniane wyżej wyniki dotychczasowych badań), ale także poziom podstawowych umiejętności matematycznych, takich jak porównywanie liczb czy szacowanie miejsca liczby na osi liczbowej.

## **2. Metodologia**

### **2.1 Osoby badane**

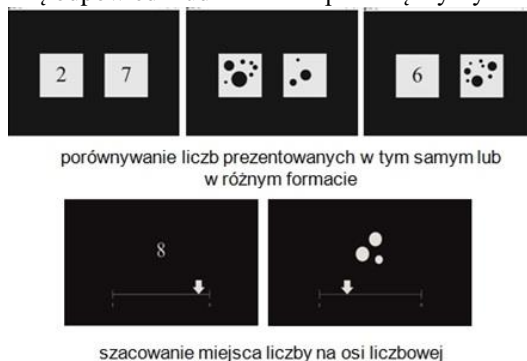
W badaniu udział wzięło 5 par bliźniąt, w tym 2 pary bliźniąt jednojajowych (dwie dziewczynki i dwóch chłopców) oraz 3 pary bliźniąt dwujajowych (bliźnięta różnopłciowe). Badanymi byli uczniowie klas 1-3 jednej z toruńskich szkół podstawowych. Średnia wieku badanych to 8,23 (od 7 do 9,25). U żadnego z uczestników nie stwierdzono wady wzroku i słuchu czy innych deficytów, które uniemożliwiłyby udział w badaniu. Projekt badawczy uzyskał akceptację lokalnej Komisji Bioetycznej, a rodzice wszystkich badanych podpisali świadomą zgodę na udział ich dzieci w badaniu.

### **2.2 Metody**

#### **2.2.1. Test oceny umiejętności matematycznych**

Do zbadania poziomu umiejętności matematycznych wykorzystano test komputerowy "Prokalkulia 6-9. Test oceny behawioralnych wskaźników umysłowych reprezentacji liczb i ryzyka dyskalkulii" (Gut i in. 2016). Jest to zestaw zadań sprawdzających ukształtowanie niewerbalnych reprezentacji liczb - pozwala między innymi na pomiar poziomu umiejętności porównywania liczb (wskazywanie większej z dwóch wyświetlanych liczb) w formie symbolicznej (cyfry arabskie) i niesymbolicznej (zestawy kropek) oraz określania miejsca liczb na osi liczbowej bez podziałki, prezentowanych w formie zarówno symbolicznej jak i niesymbolicznej (rys. 1). Program oblicza medianę czasu reakcji i średni procent poprawnych odpowiedzi w zadaniach polegających na porównywaniu liczb, a także wielkość błędu szacowania miejsca liczb na osi, obliczany jako

odległość (w pikselach) między miejscem właściwym dla liczby a tym wskazanym przez dziecko, dzieloną przez długość osi i pomnożoną przez 100%. W zadaniach z pomiarem czasu i poprawności reakcji badani odpowiadali poprzez naciskanie jednego z dwóch klawiszy na klawiaturze komputera, natomiast w zadaniach z osią odpowiedzi udzielano za pomocą myszy komputerowej.



**Rys. 1.** Przykładowe bodźce z zadań w teście Prokalkulia 6-9

### 2.3 Aparatura badawcza

Do przeprowadzenia testu użyto komputera DELL Inspiron 2000 z systemem operacyjnym Windows 10 Home, procesorem Intel Core i3-5005U, monitorem o przekątnej 17,3” i z podświetleniem LED o rozdzielczości 1600 x 900 oraz komputera DELL Inspiron 17R, z procesorem Intel Core i5-430M, monitorem o przekątnej 17,3” z podświetleniem LED o rozdzielczości 1600 x 900. Badania zostały przeprowadzone w szkole, do której uczęszczały dzieci, w pomieszczeniu o powierzchni kilku m<sup>2</sup>. Dzieci wykonywały test indywidualnie, siedząc na krześle przy stoliku w odległości około 50 cm od ekranu laptopa. W pomieszczeniu obecny był badacz, który przedstawiał instrukcje do zadań a także wymagania dotyczące sposobu udzielania odpowiedzi. Mierzony był czas reakcji i poprawność w zadaniach z porównywaniem liczb oraz precyzja odpowiedzi w zadaniach z określaniem miejsca liczby na osi.

### 2.4 Kwestionariusze

Procedura badawcza obejmowała także badania kwestionariuszowe. Jeden był wypełniany przez rodzica (zob. 2.4.1.) oraz jeden był wypełniany z dzieckiem (zob. 2.4.2). Po wypełnieniu obu kwestionariuszy jak i zgody na udział w badaniu dziecko przystępowało do badania przy użyciu testu Prokalkulia 6-9. Po zakończeniu całej procedury, poproszono także wychowawców przebadanych dzieci o wypełnienie kwestionariusza dotyczącego podstawowych kompetencji matematycznych dziecka (zob. 2.4.3.).

#### 2.4.1. Kwestionariusz dla rodzica

Przed przystąpieniem dziecka do testu określającego poziom zdolności matematycznych proszono rodziców o wypełnienie kwestionariusza. Był on wypełniany tuż po otrzymaniu wszystkich informacji dotyczących badania i po podpisaniu świadomej zgody na udział w badaniu. Pozwolił on na zebranie podstawowych informacji na temat dziecka tj. wiek, płeć, ręczność, a także na temat stanu psychofizycznego dziecka (czy występują u niego jakieś deficyty lub czy jest pod stałą opieką lekarza specjalisty/psychoterapeuty). Rodzic był także pytany o aktywność dziecka w zakresie grania w gry komputerowe i oglądanie telewizji.

#### 2.4.2. Kwestionariusz dla dziecka

Kwestionariusz dla dziecka obejmował pytania na temat jego preferencji spędzania czasu jak i zainteresowań szkolnych. Dziecko z pomocą badacza udzielało odpowiedzi zaznaczając jedną z pięciu „buziek” (emotikon) odzwierciedlających odpowiedź na pytanie: najbardziej uśmiechnięta „buźka” oznaczała odpowiedź „uwielbiam”, zaś najsmutniejsza – „nie cierpię”. Numerom pytań w kwestionariuszu (zob. Tab. 4) odpowiadały kolejno: 1- „Czy lubisz uczyć się czytać?”, 2- „Czy lubisz uczyć się liczyć?”, 3- „Czy lubisz uczyć się rysować?”, 4- „Czy lubisz poznawać świat roślin i zwierząt?”, 5- „Czy lubisz grać w gry komputerowe?”.

#### 2.4.3. Kwestionariusz dla nauczyciela

Pozwolił on na zebranie informacji dotyczących ewentualnych problemów w matematyce obserwowanych u dziecka lub jego szczególnych zdolności w tym obszarze. Kwestionariusz składał się z indywidualnych ocen dzieci w zakresie rozumienia materiału związanego z nauką matematyki, samodzielności i systematyczności w wykonywaniu zadań matematycznych, umiejętności przeliczania, szacowania, porównywania liczb oraz wykonywania podstawowych zadań arytmetycznych (dodawanie, odejmowanie, zapisy arytmetyczne). Numerom pytań (zob. Tab. 5) odpowiadają kolejno następujące aspekty umiejętności w zakresie matematyki: 1 - „Rozumienie materiału związanego z nauką matematyki”, 2 - „Samodzielność w wykonywaniu zadań matematycznych”, 3 - „Systematyczność pracy ucznia”, 4 - „Umiejętność przeliczania”, 5 - „Umiejętność porównywania liczb (relacje więcej- mniej)”, 6 - „Szacowanie liczebności”, 7 - „Dodawanie, odejmowanie, zapis działań arytmetycznych”, 8 - „Rozpoznawanie (znajomość) liczb”. Nauczyciel oceniał umiejętności dziecka za pomocą skali 1-7. W przypadku pozycji kwestionariusza 1-3 odpowiedź „1” oznaczała „Bardzo duże problemy”, a odpowiedź „7” oznaczała „Nie obserwuję żadnych problemów”, natomiast w pozycjach 4-8 odpowiedź „1” oznaczała „Bardzo niski poziom”, a odpowiedź „7”- „Bardzo wysoki poziom”.

#### 2.5 Test inteligencji

Po zakończeniu badań przeprowadzono również badanie ilorazu inteligencji dzieci przy użyciu Skali Inteligencji Wechslera dla Dzieci, czyli WISC-R (Wechsler 1991).

### 3. Wyniki

W opisie wyników skoncentrowano się na porównaniach dzieci będących rodzeństwem, zestawiając wyniki z poszczególnych zadań testu Prokalkulia 6-9 oraz kwestionariuszy i testu WISC-R (zob. Tab. 1-5) wewnątrz par bliźniąt. Innymi słowy, porównano ze sobą wyłącznie dzieci będące rodzeństwem (np. brata z siostrą), zaś nie porównywano dzieci z jednej pary bliźniąt z dziećmi z innych par bliźniąt (nie skupiano się na porównaniach między parami). Tab. 1 przedstawia mediany czasu reakcji uzyskane przez dzieci w zadaniach na porównywanie liczb (wskazywanie większej liczby z dwóch prezentowanych na ekranie). Zamieszczono tu wyłącznie wyniki dla czasu reakcji, ponieważ różnice w procencie poprawnych odpowiedzi różniły się w parach bardzo nieznacznie (poprawność była wysoka w przypadku wszystkich dzieci, ze względu na fakt, że zadania były dla dzieci stosunkowo proste i dlatego czas reakcji był w tym przypadku jedynym wskaźnikiem różnic w poziomie badanych umiejętności).

**Tab. 1.** Mediana czasu reakcji (RT) mierzonego w milisekundach w zadaniach polegających na porównywaniu wielkości liczb przedstawionych w różnych formatach (CC - porównywanie cyfry z cyfrą, KK - porównywanie liczby dwóch zbiorów kropek, CK - porównywanie cyfry z liczbą kropek)

Para bliźniąt		RT CC	RT KK	RT CK
jednojąkowe, chłopcy	A.J.	899,66	776,11	1328,15
	K.J.	702,71	418,11	780,91
jednojąkowe, dziewczynki	A.F.	969,41	769,01	1337,97
	L.F.	1245,44	1169,52	1102,53
dwujajowe	Z.G.	624,99	476,55	890,61
	F.G.	584,2	631,96	1036,06
dwujajowe	J.B.	875,07	809,62	1166,31
	A.B.	591,671	680,141	1053,041
dwujajowe	O.W.	1147,77	809,94	1366,43
	I.W.	749,41	665,33	1033,71

Wyniki wskazują na wyraźne różnice pomiędzy rodzeństwem we wszystkich parach bliźniąt. W przypadku bliźniąt jednojąkowych zarówno w przypadku chłopców jak i dziewczynek, jedno



z rodzeństwa (kolejno A.J. i L.F) wypadło gorzej od swojego rodzeństwa we wszystkich trzech zadaniach.

W 3-ciej parze bliźniąt (bliźnięta dwujajowe) dziewczynka ma krótszy czas reakcji w zadaniach na porównywanie liczb przedstawionych jako zestawy kropek, a także w formacie mieszanym, natomiast chłopiec wypadł lepiej w zadaniu na porównywanie liczb przedstawionych jako cyfry. W kolejnych 2 parach bliźniąt dwujajowych, we wszystkich 3 zadaniach jedno z nich (odpowiednio: A.B. oraz I.W.), mieli krótszy czas reakcji w porównaniu do drugiego z rodzeństwa (swojej siostry).

W Tab. 2 zestawiono wyniki dzieci uzyskane w zadaniach z szacowaniem miejsca liczby na osi. Zaprezentowano tu zarówno wielkość błędu szacowania miejsca liczby (dla obu formatów), jak również wielkość przeszacowania (przesunięcia w prawo w stosunku do właściwej pozycji liczby) i niedoszacowania (przesunięcia w lewo). Jak widać, znaczące różnice zaobserwowano w pierwszej parze bliźniąt jednojajowych, gdzie jeden z chłopców miał o wiele mniejszą dokładność lokalizacji miejsca liczby na osi. Różnice te są szczególnie widoczne w wielkości błędu szacowania jak i niedoszacowania (zarówno dla cyfr, kropek jak i ogółem dla obu formatów). Wyniki dziewczynek jednojajowych znacząco różniły się tylko w wielkości błędu szacowania i niedoszacowania dla kropek oraz niedoszacowania ogółem dla obu zadań. W przypadku kolejnych dwóch par bliźniąt, różnice pomiędzy rodzeństwem w tym zadaniu nie były aż tak duże. Ostatnia para bliźniąt różni się dokładnością w niedoszacowaniu miejsca liczby zarówno w przypadku kropek jak i ogółem dla obu formatów.

**Tab. 2.** Wyniki z zadania na szacowanie miejsca liczby na osi (C – liczba prezentowana w formacie symbolicznym, K – w formacie niesymbolicznym, ogółem – średni wynik dla obu formatów razem)

Para bliźniąt		Wielkość błędu szacowania - Przeszacowanie - C	Niedoszacowanie - C	Wielkość błędu szacowania - Przeszacowanie - K	Niedoszacowanie - K	Wielkość błędu szacowania - Przeszacowanie - ogółem	Niedoszacowanie - ogółem			
jednojajowe, chłopcy	A.J.	12,55	6,65	15,4	17,24	4,92	23,06	15,68	5,54	20,51
	K.J.	4,95	2,86	7,73	7,2	4,7	9,55	6,45	3,9	9,05
jednojajowe, dziewczynki	A.F.	13,78	2,43	18,42	6,14	1,62	7,85	8,68	1,87	11,33
	L.F.	13,85	5,65	18,72	16,69	5,71	21,33	15,75	5,69	20,52
dwujajowe	Z.G.	4,35	3,84	5,15	4,37	3,48	5,35	4,36	3,62	5,3
	F.G.	3,17	1,35	4,34	3,36	1,03	4,56	3,3	1,16	4,49
dwujajowe	J.B.	2,43	2,12	2,79	1,81	2,7	3,3	2,69	2,5	3,12
	A.B.	3,97	2,71	4,81	5,64	1,98	7,97	5,08	2,18	6,87
dwujajowe	O.W.	8,32	4,77	11,01	6,09	3,92	8,26	7,2	4,26	9,77
	I.W.	10,76	5,33	15,1	13,34	3,3	16,33	12,05	4,71	15,82

Porównano także wyniki dzieci uzyskane w teście Wechslera w poszczególnych parach bliźniąt. Tab. 3 prezentuje zestawienie wartości ilorazu inteligencji dla skali werbalnej, niewerbalnej i pełnej. Szczególnie wyraźne różnice można zauważyć w parze bliźniąt J.B. i A.B.. Z kolei w przypadku bliźniaczek jednojajowych widać niemal brak różnic w uzyskanych wynikach (wartości ilorazu inteligencji w skali werbalnej i niewerbalnej są identyczne).

Dzieci w obrębie par bliźniąt porównano także pod względem odpowiedzi udzielanych w kwestionariuszu (Tab. 4.). W tym kwestionariuszu dzieci odpowiadały zaznaczając jedną z pięciu „buziek” gdzie najbardziej uśmiechnięta (w Tab. 4 oznaczona numerem 1) oznaczała „Uwielbiam”, a najbardziej smutna (w Tab. 4 oznaczona numerem 5) oznaczała „Nie cierpię”. Wyniki z tego kwestionariusza w parach bliźniąt są do siebie bardzo podobne.

**Tab. 3.** Wyniki testu inteligencji Wechslera (WISC-R).

Para bliźniąt		Skala pełna	Skala słowna	Skala bezsłowna
jednojąkowe, chłopcy	A.J.	109	99	118
	K.J.	117	110	121
jednojąkowe, dziewczynki	A.F.	123	117	125
	L.F.	123	117	127
dwujajowe	Z.G.	105	92	118
	F.G.	95	74	118
dwujajowe	J.B.	112	100	82
	A.B.	82	82	86
dwujajowe	O.W.	112	93	130
	I.W.	106	100	111

**Tab. 4.** Wyniki z kwestionariusza ogólnego dla dziecka.

Para bliźniąt	Numer pytania w kwestionariuszu					
		1	2	3	4	5
jednojąkowe, chłopcy	A.J.	3	1	1	3	1
	K.J.	2	1	1	2	1
jednojąkowe, dziewczynki	A.F.	2	1	1	1	2
	L.F.	3	1	1	2	1
dwujajowe	Z.G.	2	2	1	2	1
	F.G.	2	3	2	4	1
dwujajowe	J.B.	3	2	1	1	1
	A.B.	3	3	1	2	3
dwujajowe	O.W.	2	2	1	1	3
	I.W.	3	3	1	1	1

Kwestionariusz dla nauczyciela pozwolił na zebranie opinii wychowawcy na temat poszczególnych zdolności lub problemów w matematyce, które zaobserwował w trakcie lekcji. Każde rodzeństwo uczęszczało do tej samej klasy, a więc miało tego samego nauczyciela. Zgodnie z opinią nauczyciela danej pary rodzeństwa, nie ma wyraźnych różnic w poziomie umiejętności matematycznych czy obserwowanych problemów pomiędzy rodzeństwem w każdej z par.

**Tab. 5.** Wyniki z kwestionariusza dla nauczyciela.

Para bliźniąt	Numer pytania w kwestionariuszu									
		1	2	3	4	5	6	7	8	
jednojąkowe, chłopcy	A.J.	7	6	5	6	6	5	6	6	
	K.J.	6	5	5	5	4	5	5	5	
jednojąkowe, dziewczynki	A.F.	6	6	6	6	7	7	6	7	
	L.F.	7	7	7	7	7	7	7	7	
dwujajowe	Z.G.	5	5	5	5	5	5	5	6	
	F.G.	4	4	4	5	5	4	4	6	
dwujajowe	J.B.	Brak danych (kwestionariusz dla nauczyciela nie został dostarczony badaczom).								
	A.B.									
dwujajowe	O.W.	7	6	5	5	6	6	6	7	
	I.W.	5	5	6	6	6	6	5	6	

#### 4. Dyskusja i wnioski

Jak wcześniej wspomniano bliźnięta jednojajowe mają ten sam genotyp, a więc wszystkie różnice w ich zdolnościach poznawczych nie są uwarunkowane genami, lecz innymi czynnikami zewnętrznymi (np. specyficznym środowiskiem). Uzyskane w tym badaniu wyniki chłopców (będących bliźniętami MZ) znacznie różnią się od siebie. K.J. wypadł lepiej w zadaniach na porównywanie liczb przedstawionych w różnych formatach - jego czas reakcji był krótszy od tego uzyskanego przez brata. Tak samo, w zadaniach dotyczących lokalizacji miejsca liczby na osi - większą precyzją również wykazał się A.J. Indywidualne różnice w poziomie zdolności matematycznych w tej parze bliźniąt mogą więc wynikać z wpływu specyficznego środowiska, np. innej relacji z nauczycielem lub znajomymi w szkole, a nawet z powodu mniejszej ilości czasu, który bracia poświęcają zadaniom matematycznym zarówno w szkole jak i w domu. Istnieje jednak możliwość, że wyniki jednego z chłopców są gorsze ze względu na obniżoną motywację podczas wykonywania testu (duża liczba zadań może powodować słabsze skupienie) lub nawet nudę spowodowaną zbyt łatwymi zadaniami. To może sugerować różnice między tymi bliźniętami w profilu osobowości. Kontynuując badania z udziałem tych dzieci warto prześledzić tę kwestię wykonując odpowiednie testy psychologiczne. W przypadku dziewczynek (bliźniaczek MZ), część wyników była do siebie podobna, jednak w niektórych przypadkach różniły się one czasem reakcji lub dokładnością określania miejsca liczby na osi liczbowej. Analogicznie jak w przypadku chłopców MZ - na indywidualne różnice w tej parze mogą wpływać czynniki zewnętrzne lub obniżona motywacja podczas wykonywania testu u jednej z siostr. Warto podkreślić, że dziewczynki mają z kolei prawie identyczny poziom ilorazu inteligencji. Z rozmowy z mamą dziewczynek wynikało, że są one (w jej ocenie) bardzo do siebie podobne pod względem zachowania, zainteresowań, sposobu spędzania czasu. Ich mama podkreślała, że siostry „wszystko robią razem i wszystko robią tak samo”. Jak się wydaje, znajduje to swoje odzwierciedlenie w wynikach testu WISC-R, choć nie widać tego z kolei w ocenie nauczycielki dziewczynek – jedna z bliźniaczek jest oceniana nieco niżej niż siostra.

W przypadku bliźniąt dwujajowych, można zaobserwować znaczące różnice między rodzeństwem w każdej badanej parze. Różnice te dotyczą zarówno pomiarów czasu reakcji w porównywaniu liczb przedstawionych w różnych formatach jak i precyzji określania miejsca liczby na osi.

Dodatkowo, w wynikach wszystkich par bliźniąt można zauważyć, że większy problem w szacowaniu miejsca liczby na osi wynika głównie z niedoszacowania niż przeszacowania (dzieci raczej mają tendencję do lokalizowania liczb za bardzo na lewo od ich właściwych pozycji niż do przesuwania miejsca tej lokalizacji za bardzo na prawo).

Kwestionariusz dla dzieci pozwolił nam na zebranie informacji na temat ich zainteresowań. Wart podkreślenia jest fakt, że największe różnice zauważamy w przypadku par bliźniąt dwujajowych. Różnice te dotyczą stopnia zainteresowania grami lub światem roślin i zwierząt. Deklaracje zainteresowań w przypadku bliźniąt jednojajowych były często takie same, a ewentualne różnice były bardzo małe.

Wynikiem, na który również warto zwrócić uwagę jest bardzo podobny (poza nielicznymi wyjątkami) dla obojga rodzeństwa w każdej parze profil oceny umiejętności matematycznych dokonywany przez nauczyciela. Jak się zdaje, nauczyciel ocenia rodzeństwo trochę tak jakby „patrzył na dwie kopie tego samego ucznia” i traktował ich umiejętności w sposób tożsamy (nie rozróżniał ich umiejętności matematycznych), mimo, że – jak widzimy w wynikach z testu Prokalkulia 6-9 dzieci pod wieloma względami często bardzo się różnią, jak również widać pewne różnice w poziomie inteligencji. W tym kontekście dużym mankamentem jest brak kwestionariuszy od nauczyciela bliźniąt J.B i A.B. które różnią się od siebie wyraźnie pod względem ilorazu inteligencji, choć w wynikach z testu oceny umiejętności matematycznych nie widać bardzo dużych różnic między nimi.

Podsumowując, indywidualne różnice w poziomie wykonywania zadań matematycznych w poszczególnych parach sugerują, że w kształtowaniu umiejętności matematycznych poza determinantą genetyczną i neuronalną istotne znaczenie mają także czynniki inne niż biologiczne. Na

kształtowanie się tych zdolności może mieć więc wpływ każda styczność z materiałem liczbowym, sumienność w nauce, a nawet odmienne oddziaływanie nauczyciela na każde z rodzeństwa.

## **5. Literatura**

- American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5, Waszyngton
- Butterworth B (2010) Foundational Numerical Capacities and the Origins of Dyscalculia. *Trends in Cognitive Sciences*, 14:534-541
- Dehaene S, Molko N, Cohen L (2004) Arithmetic and the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 14:218-224
- Gut M, Goraczewski Ł, Matulewski J (2016) Prokalkulia 6-9. Test oceny behawioralnych wskaźników umysłowych reprezentacji liczb i ryzyka dyskalkulii, Pomorskie Centrum Diagnostyki, Terapii i Edukacji Matematycznej Promathematica
- Kucian K, von Aster M (2015) Developmental dyscalculia. *European Journal of Pediatrics*, 174:1-13
- Košć L (1982) Psychologia i patopsychologia zdolności matematycznych. Warszawa: Wydawnictwo Radia i Telewizji
- Oniszczenko W, Dragan W (2008) Genetyka zachowania w psychologii i psychiatrii, 13-15, 49-58
- Shalev RS, Manor O, Kerem B et al. (2001) Developmental dyscalculia is a familial learning disability. *Journal of learning disabilities*, 34(1), 59-65
- Wechsler D (1991) WISC-III: Wechsler intelligence scale for children: Manual. Psychological Corporation
- Willcutt E, Pennington B, Duncan L (2010) Understanding the complex etiologies of developmental disorders: behavioral and molecular genetic approaches, *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, 31(7): 533-544

## **20. Towards 2+1 photon tomography: Energy-based selection of two 511 keV photons and a prompt photon with the J-PET scanner.**

Masełek R.<sup>(1)</sup>, Krzemień W.<sup>(2)</sup>, Klimaszewski K.<sup>(1)</sup>, Raczyński L.<sup>(1)</sup>, Kowalski P.<sup>(1)</sup>, Shopa R.<sup>(1)</sup>, Wiślicki W.<sup>(1)</sup>, Białas P.<sup>(3)</sup>, Curceanu C.<sup>(4)</sup>, Czerwiński E.<sup>(3)</sup>, Dulski K.<sup>(3)</sup>, Gajos A.<sup>(3)</sup>, Głowacz B.<sup>(3)</sup>, Gorgol M.<sup>(5)</sup>, Hiesmayr B.<sup>(6)</sup>, Jasińska B.<sup>(5)</sup>, Kisielewska D.<sup>(3)</sup>, Korcyl G.<sup>(3)</sup>, Kozik T.<sup>(3)</sup>, Krawczyk N.<sup>(3)</sup>, Kubicz E.<sup>(3)</sup>, Mohammed M.<sup>(3, 6)</sup>, Pawlik-Niedźwiecka M.<sup>(3)</sup>, Niedźwiecki S.<sup>(3)</sup>, Pałka M.<sup>(3)</sup>, Rudy Z.<sup>(3)</sup>, Sharma N.G.<sup>(3)</sup>, Sharma S.<sup>(3)</sup>, Silarski M.<sup>(3)</sup>, Skurzok M.<sup>(3)</sup>, Wieczorek A.<sup>(3)</sup>, Zgardzińska B.<sup>(5)</sup>, Zieliński M.<sup>(3)</sup>, Moskal P.<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Department of Complex Systems, National Centre for Nuclear Research, 05-400 Otwock-Świerk, Poland

<sup>(2)</sup> High Energy Physics Division, National Centre for Nuclear Research, 05-400 Otwock-Świerk, Poland

<sup>(3)</sup> Faculty of Physics, Astronomy and Applied Computer Science, Jagiellonian University, 30-348 Cracov, Poland

<sup>(4)</sup> INFN, Laboratori Nazionali di Frascati, 00044 Frascati, Italy

<sup>(5)</sup> Institute of Physics, Maria Curie-Skłodowska University, 20-031 Lublin, Poland

<sup>(6)</sup> Faculty of Physics, University of Vienna, 1090 Vienna, Austria

<sup>(7)</sup> Department of Physics, College of Education for Pure Sciences, University of Mosul, Mosul, Iraq  
Science tutor: PhD Krzemień Wojciech

Masełek Rafał: Rafal.Maselek@ncbj.gov.pl

Keywords: 2+1 photon tomography, J-PET, scandium, positron emission tomography, triple-coincidence

### **Abstract**

The possibility to separate signals caused by 511 keV photons created in annihilation of electron-positron pairs and the so-called prompt photons from nuclei de-excitation is investigated. It could potentially be used to improve the quality of reconstructed images in the J-PET scanner in 2+1 photon tomography.

Firstly, a research is conducted for several radioisotopes that decay via  $\beta^+$  decay followed by de-excitation of an excited nucleus. Efficiency, purity and false positive rate are calculated for each isotope as a function of energy deposited threshold, with a hypothesis that signals caused by 511 keV photons deposit smaller values of energy than the selected threshold, while prompt photons deposit larger energy than the threshold. Analysis of the results accompanied with physical properties of radioisotopes suggests using  $^{44}\text{Sc}$ , which is the most promising candidate for medical applications.

With the use of GATE and J-POS simulation software, in-phantom scattering was introduced and the best energy deposited threshold value was estimated to be approximately 375 keV. It corresponds to almost 100% efficiency for 511 keV signals, 75% purity for 511 keV photons, and approximately 70% efficiency and purity for prompt photons.

### **1. Introduction**

#### **1.1 Positron Emission Tomography (PET)**

Positron Emission Tomography (PET) is a well-established method of medical imaging, used mainly for cancer and many kinds of brain diseases diagnosis. A patient is given a pharmaceutical with selected radioactive isotopes attached. Compounds travel through patient's circulatory system and accumulate in organs, especially in kidneys and bladder. Due to the high metabolism of cancer cells, tracer often accumulates there, providing doctors with a tool for detecting diseases. Radioactive isotopes decay via the  $\beta^+$  process with the emission of positrons — electron's antiparticles. The positron annihilates with an electron from patient's body and their masses are transformed into two back-to-back emitted photons with 511 keV energy each.

Photons leave patient's body and are registered by the PET scanner. Positions and times of registered photons form the input set to reconstruct the map of the tracer activity, which is then used in the diagnosis. Radiologists seek for regions of abnormal emission, which are suspected to contain cancer cells or other malicious processes.

In the first stage of the data reconstruction, the registered signals are filtered according to several criteria to select the events coming from the two 511 keV photons e.g. by selecting pairs of signals within some time period. In the next step, the reconstructed positions of interaction with scintillators are established, and a *line of response (LOR)* is obtained — it is a straight line in space that connects points of interaction. The point of emission is located somewhere on a line of response. The modern PET scanners register not only the position and energy of photons, but also the time of detection in the scintillator. The position of the emission point can be determined more accurately by using the Time-of-Flight method, by measuring the difference in time of registering each of the two signals selected. In principle, if the emission point was located closer to one of the scintillator detectors, then one of the signals will be registered earlier. The closer the source was, the greater is the time interval between registration of two signals.

The registered data set will be contaminated with the events coming from other processes, most notably multiple scattering. There is a high probability that photons created in annihilation process will be scattered inside patient's body before reaching the detector. It may also happen that a photon after scattering in one of scintillator crystals will rescatter in another one. It leads to several misidentification cases:

1. At least one of the photons will lose a vast amount of energy, so the algorithm will reject it, as originating from other process than electron-positron pair annihilation.
2. At least one of the photons will change its direction, so the line of response will not contain the emission point — in extreme cases the LOR can be located totally outside patient's body.
3. One of the photons will not be registered by the detector.
4. One of the photons will not be registered by the detector, but another photon (e.g. background originated) will fit into the time window, so an artificial event will be registered.
5. One photon will scatter twice in different scintillators, and will be treated as two different signals.
6. One of the photons will be correctly registered, however, the second one will scatter twice in scintillator crystals, but only the second scattering will be registered. One of the endpoints of the LOR will be wrong.

Besides of the situations listed above, there many other factors that need to be included when reconstructing an image out of a PET scan. New algorithms are still being developed to decrease the number of fake signals without losing too much statistics.

## 1.2 J-PET experiment

The J-PET project aims at constructing a novel PET scanner based on plastic scintillators and the dedicated ultra-fast electronics (Moskal et al. 2014; Raczynski et al. 2017; Moskal et al. 2016). Plastic scintillators are much cheaper compared to crystals used in commercial PET scanners. In addition, plastic can be produced in larger blocks, which effectively allows to cover a large part of the patient's body during single measurement. The excellent timing accuracy of about 100 ps (<http://koza.if.uj.edu.pl/pet/>) permits to use the J-PET scanner also for fundamental studies e.g. discrete symmetries and quantum entanglement (Hiesmayr & Moskal 2017).

In addition to the above mentioned advantages, the J-PET scanner contains many novel improvements when compared to ordinary PET scanners. In typical PET scanners, scintillation crystals are located radially, creating rings that increase the size of the device and allow to measure only small area at once. Plastic scintillation strips of the J-PET scanner are located alongside patient's body. Not only it enables to scan a large body part at once, but also decreases the overall size of the scanner, which opens the possibility to put the J-PET scanner inside other imaging device, such as Magnetic Resonance Imaging scanner or Computer Tomography scanner. Due to the modular construction of the scanner, J-PET can be adjusted to fit into different types of external imaging devices, as well as be adapted for different purposes, for example performing PET scans of large

animals. The excellent timing resolution of the J-PET scanner will be further improved by using the silicon multipliers (SIMP).

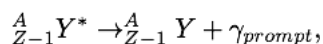
The current prototype built at the Jagiellonian University laboratory consists of three cylindrical layers of plastic scintillation strips, each with size  $7 \times 19 \times 500 \text{ mm}^3$ . The inner layer has radius of 425 mm and contains 48 strips, the second one has radius of 467.5 mm and 48 strips, and the outer layer has radius 575 mm and 96 strips. The photo of the prototype is visualized in (Fig.1.). The group at the Jagiellonian University is currently working on constructing a new version of prototype, which would be more compact and have faster electronics.



**Fig. 1.** The first full scale prototype of the J-PET scanner. Plastic scintillation strips (black) are visible, as well as photomultiplier tubes (grey) (Niedzwiecki et al. 2017).

### 1.3 2+1 photon tomography

In this study we evaluate the possibility and usefulness of using radioactive isotopes for which positron emission is accompanied by the emission of an additional photon from nucleus de-excitation, the so called *prompt photon*. For such radioisotopes  $\beta^+$  decay can be represented in the following way:



where \* superscript denotes excited nucleus. Positron created in a  $\beta^+$  decay annihilates with electron, and two back-to-back photons are emitted. The excited nucleus de-excites:

and a prompt photon is emitted. The energy of the prompt photon is specific for a given isotope. Some radioisotopes can emit prompt photons with one of a few energies, however, in this study only isotopes that emit only one type of prompt photons are taken into account.

In typical PET scanners the events with the registered prompt photons are discarded as unwanted background. In case of the J-PET scanner, the class of three-photon events with the registered prompt photon can be used to improve the image quality. It is based on a critical assumption: the emission of a prompt photons takes place in a short time after the electron-positron annihilation, and nearby. This allows us to treat both processes as a single event consisting of emission of two 511 keV back-to-back photons and a single prompt photon, with the given de-excitation energy, and an isotropic momentum distribution. The registration of three gamma quanta would allow to further reduce the uncertainty of the emission point location, and leads to the drastic improvement in the image accuracy with respect to the two-photon tomography.

## 2. Methods

### 2.1 Simulation framework

All results presented in this study are obtained using a dedicated Monte Carlo simulation framework based on Cern Root 6, called *J-POS* (<https://github.com/IPETTomography/j-pet-ortho-simulations>).

It is optimized for fast simulations of photon production and Compton scattering. The latest version is capable of simulating:

- Single photon emission, with a specific energy, in one of isotropically distributed directions,
- 2-photon emission from positron-electron annihilations,
- 3-photon decays of o-Ps (ortho-positronium) systems,

2+1 photon events from beta decays accompanied by nucleus de-excitation. Simulations of radioisotopes, which emit prompt photons with different energies, are possible, however, in this study only those that emit prompt photons with single specific energy are considered.

Smearing of the deposited energy in scintillators, due to finite detectors' efficiency, is implemented using experimentally derived formula:

where  $E$  is the energy deposited by incident photon prior to scattering. The energy of the

$$\rho(E) = Gauss(\mu = E, \sigma = 0.044\sqrt{E}),$$

scattered photon is randomly generated using the above probability density function. The main source of the background in the PET examination comes from the events in which at least one of the photon is scattered already in the patient's body.

For the purpose of this study, we simulate a simple spherical phantom filled with water. Although, the J-POS simulation framework does not implement full phantom simulation, the change of energy of photons due to initial scattering was considered, assuming that a certain (constant) fraction of all detected photons undergo the scattering in the phantom. The fraction of scattering events is established using GATE simulation software package

**Tab. 1.** Radioisotopes taken into account

Isotope	T <sub>1/2</sub>	Energy of prompt photon [keV]	Prompt photon emission probability [%]
<sup>14</sup> O	71.0 s	2312	99.4
<sup>22</sup> Na	2.60 y	1275	99.9
<sup>44</sup> Sc	3.97 h	1157	100
<sup>68</sup> Ga	67.8 m	1077	1.35

### 2.1 Aim of the study

The study is conducted to check how efficiently the prompt de-excitation photon can be distinguished from 511 keV photons based only on the spectra of energy deposited in scintillation strips. Also, the influence of the background coming from the photons scattered in the human body is estimated. Four promising isotopes (Hernandez et al. 2014; Lang et al. 2014) listed in (Tab. 1.) are considered.

If we propose the hypothesis that photons from both processes can be separated by using a single threshold on the deposited energy, then prompt photons are selected by having deposited an energy greater than the threshold, whereas 511 keV lower than the threshold. This suggests using a binary classification for both types of photons.

**Tab. 2.** Definition of True/False positive/negative terms using a binary classification.

		REAL CONDITION	
		POSITIVE	NEGATIVE
PREDICTED CONDITION	POSITIVE	True positive (TP)	False positive (FP)
	NEGATIVE	False negative (FN)	True negative (TN)



For this purpose we define the following quantities:

- (1) True positive rate (TPR/sensitivity/efficiency) — probability of detection:

$$TPR = \frac{TP}{TP + FN}$$

- (2) Positive predictive value (PPV/purity) — precision rate:

$$PPV = \frac{TP}{TP + FP}$$

- (3) False positive rate (FPR) — false alarm rate:

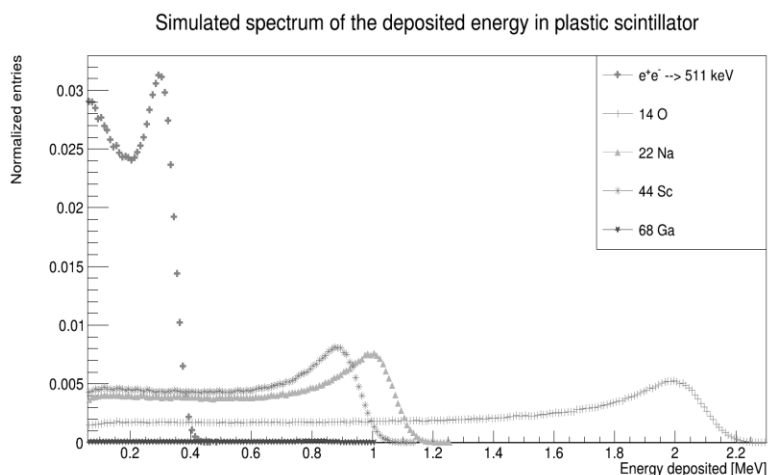
$$FPR = \frac{FP}{TN + FP}$$

We show in the following sections how these quantities allow the separation between different processes.

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Studies of deposited energy spectra of different radioisotopes

The first step of analysis is to compare the deposited energy spectra for selected radioisotopes and to check the possibility to separate signals coming from 511 keV photons from those caused by prompt photons. The process of scattering inside patient's body was not considered. It can be clearly seen from (Fig. 2.) that providing a single threshold on the deposited energy can separate photons in such a way that almost all signals from 511 keV photons would have smaller values than the threshold energy, while the majority of signals from prompt photons would deposit energy greater than the threshold value.



**Fig. 2.** Spectra of the deposited energy of different radioisotopes. The spectrum of 511 keV is added as a reference. All spectra were smeared according to experimental derived formula and normalized such that the sum of all entries from 511 keV photons add up to one. Spectra for other isotopes were scaled to match the probabilities of prompt photon emission, listed in (Tab. 1.).

To find the optimal value of threshold and to compare different isotopes, two types of plots were plotted in (Fig. 3-6.): purity and efficiency for both types of photons as a function of the energy of threshold, and the so-called ROC (Receiver Operating Characteristics) curve, defined as efficiency

vs fall-out value. ROC curves are useful in statistical data analyses. The points that are close to upper left corner of the ROC plot correspond to the best classification (high efficiency and small fall-out).

It can be seen from the ROC plots in (Fig. 3.) that the best separation can be obtained for  $^{14}\text{O}$  radioisotope. For  $^{68}\text{Ga}$  one can obtain, by taking the value of threshold around 425 keV, very good purity for both prompt and 511 keV photons, with almost 100% efficiency for 511 keV photons and an acceptable loss of efficiency for prompts. Results for  $^{44}\text{Sc}$  and  $^{22}\text{Na}$  are similar, but not as good as for  $^{14}\text{O}$  and  $^{68}\text{Ga}$ .

Unfortunately, the probability of prompt photon emission for  $^{68}\text{Ga}$  is very small (c.a. 1%), which makes it non-applicable for 2+1 photon tomography. Similarly, short half-life time for  $^{14}\text{O}$  (71s) discards it. Out of the two isotopes left,  $^{44}\text{Sc}$  is more suitable for medical use due to half-life time of approximately 4h, compared to over 2 years for  $^{22}\text{Na}$ .

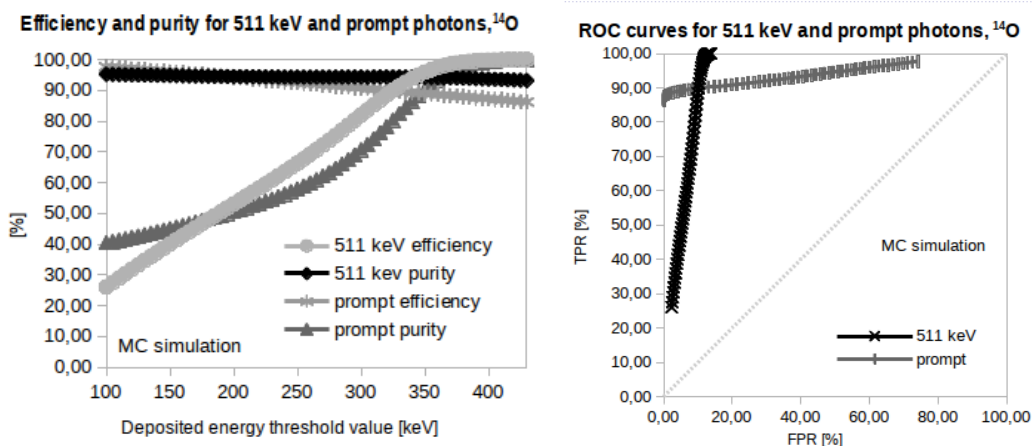


Fig. 3. Efficiency and purity as a function of deposited energy threshold value (left) and ROC curves (right) for  $^{14}\text{O}$ .

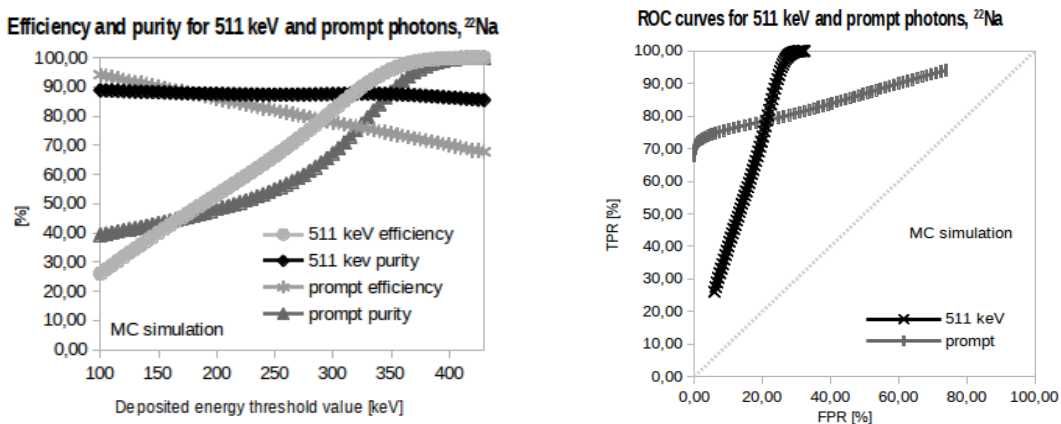
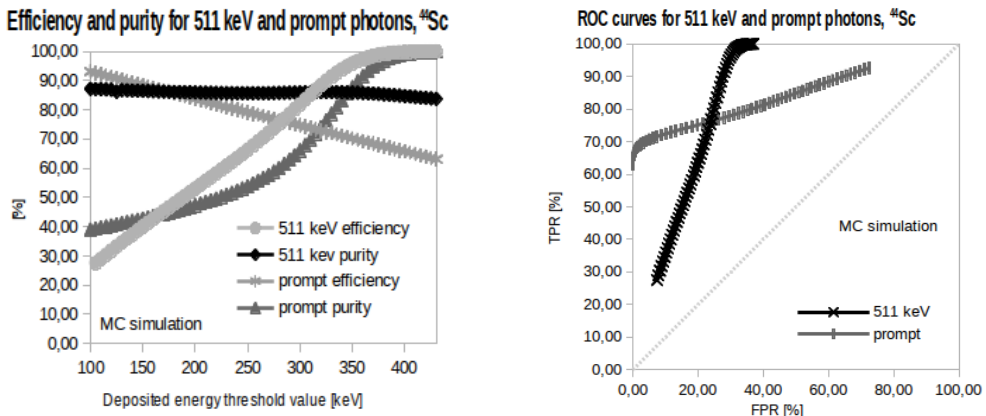
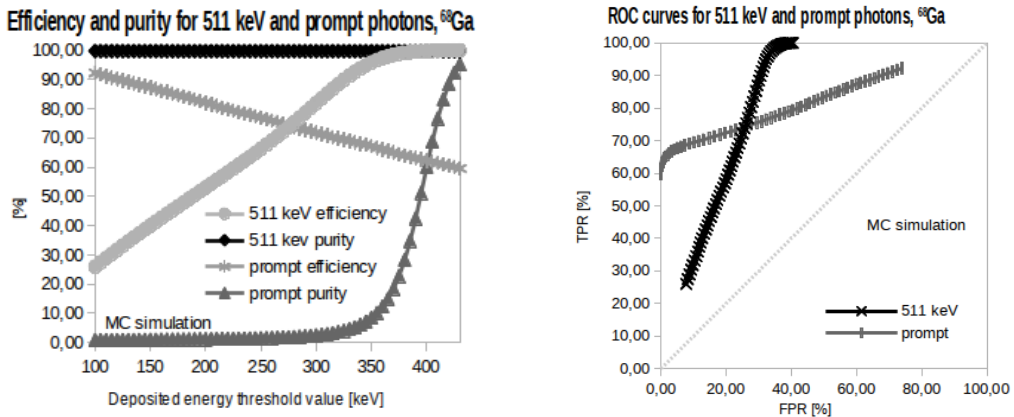


Fig. 4. Efficiency and purity as a function of deposited energy threshold value (left) and ROC curves (right) for  $^{22}\text{Na}$ .



**Fig. 5.** Efficiency and purity as a function of deposited energy threshold value (left) and ROC curves for <sup>44</sup>Sc.

Among the four radioisotopes, the performed studies show that <sup>44</sup>Sc is the most promising candidate for the medical 2+1 photon tomography. The research presented in the following sections of this article is conducted only for <sup>44</sup>Sc radioisotope.



**Fig. 6.** Efficiency and purity as a function of deposited energy threshold value (left) and ROC curves (right) for <sup>68</sup>Ga. The efficiency for 511 keV signals is almost 100%, because of the very low emission probability of prompt photon for <sup>68</sup>Ga, resulting in low number of prompt photons compared to the number of photons created in annihilation processes.

### 3.2 Determination of the fraction of scattered events in the body phantom for <sup>44</sup>Sc

In a realistic medical examination some fraction of photons, produced in electron-positron annihilation and nucleus de-excitation processes, is scattered inside patient's body. These photons cannot be used to reconstruct the location of the emission point, and create an unwanted background. In this study a rough approximation of such background is made, by adding to signal spectra of 511 keV and prompt photons after a single Compton scattering process. These spectra are weighted using ratios of numbers of in-phantom scattered photons to all registered. Ratios were obtained using Gate simulation software (<http://www.opengatecollaboration.org>) for ball-shaped water-based phantom, for four different radii. The results are presented in (Fig. 7.) together with theoretical formula for linear absorption, given by:

One can see from (Fig. 7. left part) that ratios obtained using GATE simulations have greater values

$$ratio = 1 - e^{-\mu z}$$

than theoretical predictions, however, the general characteristic of both distributions seems similar. Indeed, one can easily find, that results of the simulation follow the same formula, but with absorption factors scaled according to:

$$\mu_{sim} = 1.21 \cdot \mu_{theory}$$

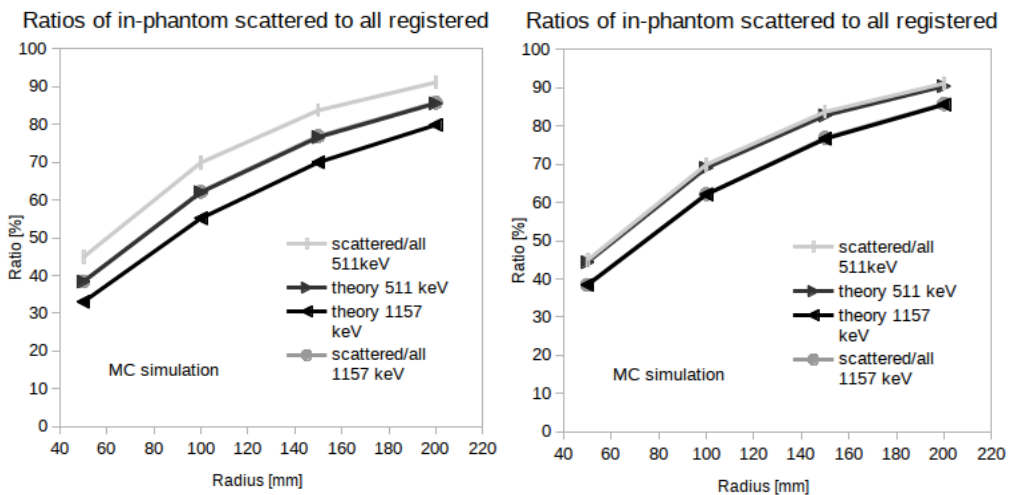
$$\mu_{sim} = 1.21\mu_{theory}$$

One can see in (Fig. 7. Right part) that after scaling the theoretical absorption coefficient, simulated data match theoretical prediction perfectly.

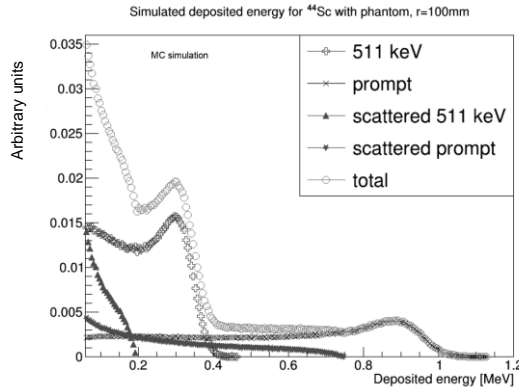
### 3.3 Deposited energy spectrum for <sup>44</sup>Sc with in-phantom scattering

The spectrum of energy deposited for <sup>44</sup>Sc is presented in (Fig.8.) A background resulting from 511 keV is included, in addition to prompt photons that were initially scattered inside phantom with radius equal to 100 mm.

Simulated deposited energy spectra for phantoms with radius of 50 mm, 150 mm and 200 mm look very similar. One can see from (Fig. 8.) that the background from scattered 511 keV can be removed by applying a single selection and disregarding signals with deposited energy lower than 200 keV. In contrary, the contribution from in-phantom scattered prompt photons cannot be removed in such way. However, one can safely assume that above approximately 750 keV all signals come from non-scattered prompt photons. Therefore, threshold should be located somewhere between 200 keV and 750 keV as it is presented in (Fig. 9.).



**Fig. 7.** Ratios of numbers of in-phantom scattered photons to all registered for 511 keV and prompt photons for <sup>44</sup>Sc. Theoretical estimations for linear absorption process are also included. The right image presents curves for which absorption coefficients are scaled according to formula  $\mu_{sim} = 1.21\mu_{theory}$ .

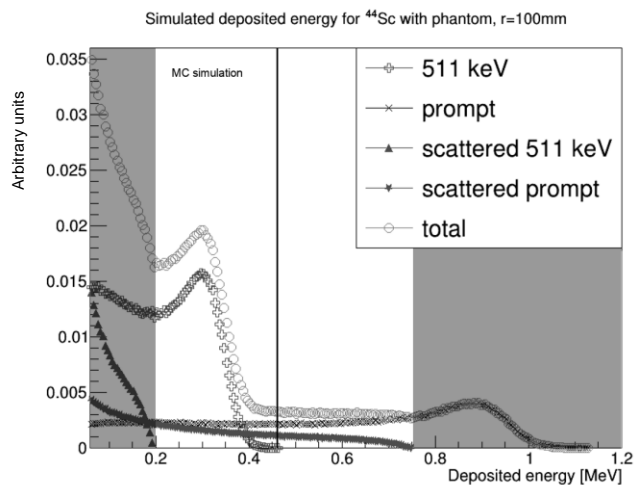


**Fig. 8.** Energy deposited spectrum for  $^{44}\text{Sc}$  with phantom, with radius 100 mm. Contributions from 511 keV and 1157 keV photons are presented, both in-phantom scattered and unscattered signals. The total (summed) spectrum is also provided.

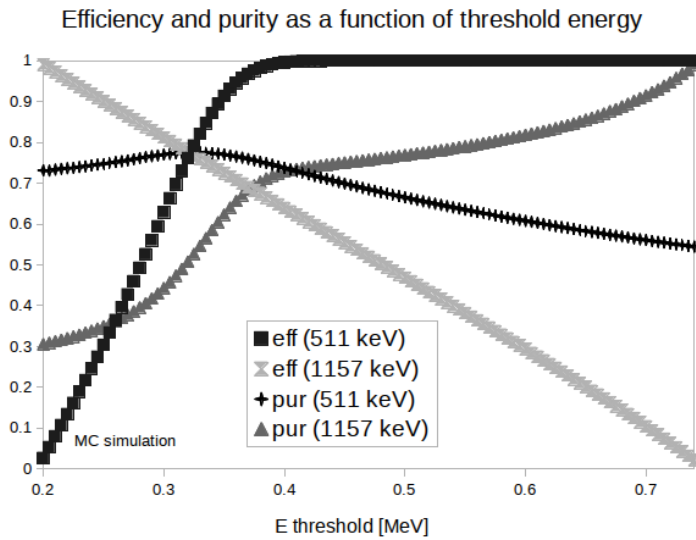
### 3.4 Optimal threshold value

To estimate the optimal deposited energy value for threshold, plots of efficiency, purity and ROC curves are plotted, similarly to section 3.1. They are presented in (Fig. 10.) and (Fig. 11.). The plots presented in (Fig. 10.) and (Fig. 11.) differ from plots presented in section 3.1 for  $^{44}\text{Sc}$ ,

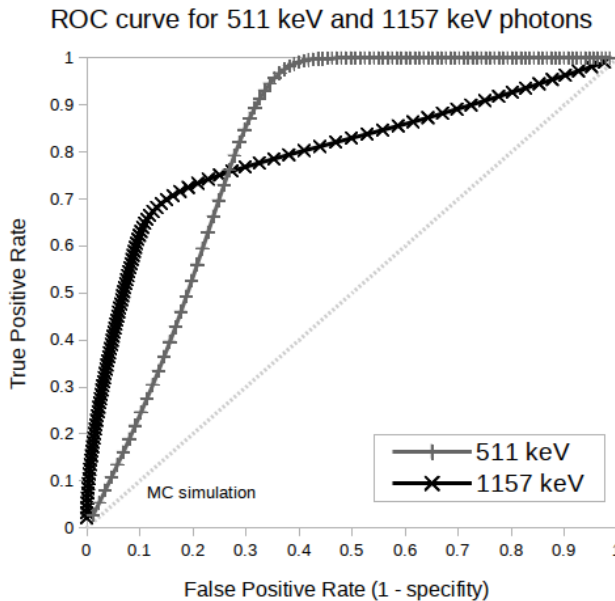
because they include background from prompt photons scattered in the phantom (background from in-phantom scattered 511 keV photons is removed by selecting only signals with deposited energy value greater than 200 keV). One of the possible criteria for electing the best classification is to choose the threshold value corresponding to the cross-section of ROC curves for prompt and 511 keV photons. The value of deposited energy threshold for that point is about 325 keV and corresponds to the intersection of efficiency curves in (Fig. 10.).



**Fig. 9.** Energy deposited spectrum for  $^{44}\text{Sc}$  with phantom, with radius 100 mm. Example value of threshold energy is denoted by the vertical line. The interesting region for threshold optimization is 200-750 keV.



**Fig. 10.** Efficiency and purity for  $^{44}\text{Sc}$  with a water phantom with radius of 100 mm.



**Fig. 11.** ROC curve plot for  $^{44}\text{Sc}$  with a water phantom with radius of 100 mm used.

Other criteria, is to treat signals from 511 keV photons as the main source of the information, while signals caused by prompt photons as an additional one. It corresponds to maximizing efficiency for 511 keV photons, and thus choosing for instance the threshold value around 375 keV, for which purity and efficiency curves of 1157 keV photons intersect.

#### 4. Conclusions

Results of the study confirm that  $^{44}\text{Sc}$  isotope is a good candidate for the 2+1 photon tomography. It is possible to efficiently distinguish between 511 keV and high-energetic 1157 keV photons based

only on the spectrum of deposited energy in plastic scintillation strips, with deposited energy threshold set to ca. 375 keV. It enables to achieve almost 100% efficiency and 75% purity for 511 keV photons, while obtaining approximately 70% efficiency and purity for prompt photons. The half-life time for  $^{44}\text{Sc}$  is approximately 4 hours, which is enough to transport radioisotopic materials to hospitals and health centers and to conduct medical examination. The contribution to energy deposited spectra from phantom-scattered 511 keV photons can be removed by simply selecting only signals with deposited energy larger than 0.2 MeV. The contribution from in-phantom scattered prompt photons cannot be removed in a similar manner. They form a linear background contributing by a factor of 13% to the overall statistics.

Due to the excellent J-PET angular resolution ( $\sim 1$  degree), the reconstructed information about the photon detection position can be used to construct statistically independent method based on the angular dependence of detected photons, that can be used to further reduce the background coming from the scattering prompt photons. The

## 5. References

- Hernandez R, Valdovinos HF, Yang Y et al. (2014)  $^{44}\text{Sc}$ : An Attractive Isotope for Peptide-Based PET Imaging. *Molecular Pharmaceutics* 11(8): 2954-2961
- Hiesmayr BC, Moskal P (2017) Genuine Multipartite Entanglement in the 3-Photon Decay of Positronium. *Scientific Reports* 7: 15349
- Lang C, Habs D, Parodi K et al. (2014) Sub-millimeter nuclear medical imaging with high sensitivity in positron emission tomography using  $\beta+\gamma$  coincidences. *Journal of Instrumentation* 9: P01008
- Moskal P, Niedźwiecki S, Bednarski T et al. (2014) Test of a single module of the J-PET scanner based on plastic scintillators. *Nuclear Instruments and Methods in Physics A* 764: 317-321
- Moskal P, Rundel O, Alfs D et al. (2016) Time resolution of the plastic scintillator strips with matrix photomultiplier readout for J-PET tomograph. *Physics in Medicine & Biology* 61: 2025-2047
- Niedźwiecki S, Białas P, Curceanu C et al. (2017) J-PET: A new technology for the whole-body PET imaging. *Acta Physica Polonica B* 48: 1567:1576
- Raczynski L, Wiślicki W, Krzemień W et al. (2017) Calculation of the time resolution of the J-PET tomograph using kernel density estimation. *Physics in Medicine & Biology* 62: 5076-5097
- <https://github.com/JPETtomography/j-pet-ortho-simulations> J-POS repositorium on github
- <http://www.opengatecollaboration.org> (visited on 14.11.2017)
- <http://koza.if.uj.edu.pl/pet/> official J-PET website, (visited on 14.11.2017)





**Recenzenci rozdziałów w monografiach z kolekcji ISBN 978-83-65677-93-8:**

dr hab. Damian Absalon, dr Jan Andrzejewski, prof. dr hab. Krzysztof Anusz, dr hab. inż. Piotr Arlet, dr hab. Katarzyna Bagan-Kurluta, dr hab. Maciej Barczewski, dr inż. Jacek Bartman, dr hab. inż. Marian Bartoszek, dr inż. Justyna Batkowska, dr inż. Piotr Bąska, dr hab. Teresa Bednarczyk, dr Jerzy Bednarski, dr Katarzyna Bergier, dr inż. Agnieszka Bielaszka, prof. dr hab. inż. January Bień, dr Barbara Bilewicz-Kuźnia, dr inż. Mariola Błaszczyk, dr Tomasz Błądek, prof. dr hab. Jacek Błęszyński, dr hab. Adam Bobryk, dr Michał Borodo, dr inż. Marta Borowska, dr inż. Tomasz Brynk, prof. dr hab. Jarosław Całka, dr Beata Całyniuk, dr hab. Witold Chabuz, dr hab. Piotr Chęłpiński, dr Dorota Chrobak-Chmiel, dr Agnieszka Chruścikowska, dr hab. Andrzej Ciężela, prof. dr hab. Jan Cielichowski, dr hab. inż. Adam Cwudziński, prof. dr hab. inż. Anna Cysewska-Sobusiak, dr Paweł Czarniecki, dr hab. Ewa Katarzyna Czech, dr inż. Małgorzata Czichy, dr inż. Klara Czyńska, dr Krzysztof Damaziak, dr hab. Paweł Daniel, dr hab. Anna Doliwa-Klepcka, dr Wioleta Drobik-Czwaro, prof. dr hab. Leszek Drodz, dr Renata Dudziak, prof. dr hab. inż. Włodzimierz Dudziński, dr inż. Krzysztof Durka, dr hab. Marzena Dyjakowska, dr Gabriela Dyrda, dr Magdalena Dziedzic, dr hab. Małgorzata Dzierżęcka-Gappa, dr inż. Małgorzata Dzieciół, prof. dr hab. inż. Marek Dziubiński, dr Marcin Dziwisz, prof. dr hab. Leonard Etel, dr hab. Beata Feledyn-Szewczyk, dr Wiesław Fidecki, dr hab. Marek Figura, dr hab. Paweł Filipiak, dr Piotr Filipiak, dr Jarosław Frączak, dr hab. Magdalena Gajęcka, dr inż. Mariusz Gamracki, prof. dr hab. Ryszard Gerlach, dr Artur Giełdoń, dr Wojciech Glac, prof. dr hab. Tomasz Głowiński, prof. dr hab. Agnieszka Gmitrowicz, dr hab. Sławomir Gonkowski, prof. dr hab. Józef Górniewicz, ks. prof. dr hab. Krzysztof Gózdź, dr Marcin Grąz, dr hab. Joanna Hawlena, dr Iga Hołyńska-Iwan, dr Magdalena Jaciow, dr Magdalena Jankowska-Wajda, dr inż. Tomasz Jankowski, dr inż. Paweł Jelec, dr hab. Andrzej Junkuszew, dr Agata Kabała-Dzik, dr Alena Kacmarova, dr Marta Kaczmarek-Ryś, dr hab. Hanna Karakuła-Juchnowicz, dr inż. Robert Kasner, prof. dr hab. inż. Nina Kazhar, dr inż. Krzysztof Kazuń, dr inż. Agata Kiciak, dr Dominika Kidaj, prof. dr hab. Marek Klimek, dr Joanna Klonowska, dr hab. Zbigniew Kobus, dr hab. Beata Kolny, dr Przemysław Kołodziej, dr inż. Bogusław Kołodziejski, dr hab. Jerzy Kopiński, dr Agnieszka Korchut, dr Grzegorz Korcyl, dr Monika Kornacka, dr hab. inż. Marta Kosior-Kazberuk, dr inż. Łukasz Kotwica, dr hab. Małgorzata H. Kowalczyk, dr Kamil Kowalski, prof. dr hab. Wojciech Kowalski, dr hab. Katarzyna Kozłowicz, dr hab. Piotr Krakowiak, dr Marlena Krawczyk-Suszek, dr hab. Marta Krenz-Niedbała, ks. dr hab. Piotr Kroczek, dr inż. Karol Król, dr Celina Kruszniak-Rajs, dr inż. Krzysztof Krzysztofowicz, dr Waldemar Kuczma, dr inż. Edyta Kudlek, dr Joanna Kula-Gradziak, dr hab. inż. Andrzej Kulig, dr inż. Tomasz Kulpa, dr Marcin Kunecki, dr hab. inż. Robert Kunkel, dr hab. Małgorzata Kwiecień, dr Marzanna Lament, prof. dr hab. Katarzyna Laskowska, dr inż. Magdalena Lech, dr inż. Justyna Libera, prof. dr hab. Tadeusz Linkner, prof. dr hab. Anna Lityńska, dr hab. Wiesław Lizak, dr inż. Aneta Lorek, dr hab. inż. Magdalena Janus, dr Tariq Mahmood, dr inż. Ewa Malczyk, dr hab. inż. Justyna Martyniuk-Pęczek, dr Sławomir Maślanka, dr hab. Jacek Matulewski, dr Artur Mazurek, dr Anna Michalska-Bańkowska, dr inż. Paweł Michalski, prof. dr hab. Jan Miciński, dr hab. ks. Bogusław Migut, dr hab. Krzysztof Mikołajczuk, dr Barbara Milewicz-Bednarska, prof. dr hab. inż. Piotr Miller, dr hab. Maria Mocarz-Kleindienst, dr Sylwia Mojsym-Korybska, dr Marta Mozgawa-Saj, dr inż. Adam Mroziński, dr hab. Dorota Narożna, dr hab. Oktawian Nawrot, prof. dr hab. Stanisław Sławomir Nicieja, dr Joanna Nieć, prof. dr hab. Mateusz Nieć, dr Jacek Niedźwiecki, dr hab. Jerzy Nita, dr Katarzyna Nowak, dr hab. Zbigniew Nowak, prof. dr hab. inż. Lucyna Nyka, dr hab. Ireneusz Ochmian, dr inż. Paweł Ogrodnik, dr hab. Dorota Olszewska-Słonina, dr hab. Krzysztof Oplustil, prof. dr hab. inż. Leszek Opyrchal, prof. dr hab. Lucjan Pająk, prof. dr hab. inż. Zbigniew Paszkowski, dr inż. Agnieszka Pawłowska, dr inż. Marek Piątek, dr inż. Paweł Pietrusiewicz, dr Karol Pilorz, dr hab. Monika Pitucha, dr hab. Magdalena Polak-Berecka, dr hab. Renata Polaniak, dr inż. Kornelia Polek-Dvraj, dr Piotr Pomorski, dr inż. Arkadiusz Popławski, dr Agnieszka Potyrańska, dr hab. Krzysztof Pudelko, dr Rafał Raczyński, dr hab. Zenon Rajfur, prof. dr hab. Konrad Rejda, dr hab. Piotr Romańczyk, dr inż. Andrzej Roszkowski, dr hab. Lucyna Rotter, dr hab. Monika Różańska-Boczula, dr inż. Jarosław Rubacha, dr inż. Maciej Rumiński, dr inż. Bogdan Ruszczak, dr hab. Justyna Rybak, dr hab. Stanisław Rybicki, dr Liliana Rytel, dr inż. Martyna Rzelewska, dr inż. Beata Sadowska, prof. dr hab. Zygmunt Sadowski, dr Artur Sajnog, dr Rafał Sawicki, dr hab. inż. Gabriela Siawrys, dr hab. inż. Jarosław Sidun, dr Grzegorz Siebielec, dr hab. inż. Waldemar Skomudek, dr hab. Agnieszka Skowrońska, prof. dr hab. Wojciech Skóra, prof. dr hab. Elżbieta Skrzypek, dr inż. Grzegorz Sławiński, dr hab. Beata Smolik, dr Marta Sobańska, prof. dr hab. Wojciech Sońta, dr hab. inż. Michał Stosiak, dr hab. Maria Straś-Romanowska, dr hab. Alicja Sułek, dr hab. Lech Szczegół, dr inż. Mirosława Szewczyk, dr Sebastian Szklener, dr Agnieszka Szuklarek, dr Łukasz Szleszkowski, dr hab. Magdalena Zulc-Brzozowska, dr hab. Józef Szymański, dr Lidia Szymczak-Mazur, prof. dr hab. inż. Adam Maria Szymski, dr inż. Małgorzata Śmist, dr hab. Janusz Świniarski, dr hab. Bożena Targońska-Stępnik, prof. dr hab. inż. Elżbieta Trocka-Leszczyńska, prof. dr hab. Paweł Turzyński, dr inż. Lechosław Tuz, dr hab. Witold Tyborowski, dr inż. Ewa Ura-Bińczyk, dr inż. Krystyna Urbańska, dr inż. Urszula Warzyńska, dr hab. Adam Waśko, dr inż. Dariusz Wawrentowicz, dr hab. Adrian Wiater, dr hab. Jacek Wilczyński, dr Lidia Anna Wiśniewska, dr hab. Piotr Wiśniewski, dr inż. Agnieszka Witecka, dr Wojciech Witkowski, dr inż. Alicja Wodnicka, dr Krzysztof Kamil Wojtanowski, dr hab. Filip Wolański, dr Łukasz Wolko, dr hab. Karolina Wójcik, prof. dr hab. Maria Wróbel, dr inż. Joanna Wyczarska-Kokot, dr Adrian Zając, dr hab. Przemysław Zalewski, dr hab. Jerzy Zalewski, dr hab. Bożena Zawadzka, prof. dr hab. Anna Zdziennicka, prof. Piotr Ziółkowski, prof. dr hab. Dariusz Zlotkowski, dr inż. Maciej Zwierzchowski

**W kolekcji „Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce” (ISBN 978-83-65677-93-8) ukazały się:**

1. Nauki przyrodnicze - Część I – Żywnienie i żywność  
(online: ISBN 978-83-65917-96-6; druk: ISBN 978-83-65917-97-3)
2. Nauki przyrodnicze - Część II (online: ISBN 978-83-65917-99-7; druk: ISBN 978-83-65917-98-0)
3. Nauki przyrodnicze - Część III (online: ISBN 978-83-66139-00-8; druk: ISBN 978-83-66139-01-5)
4. Nauki przyrodnicze - Część IV (online: ISBN 978-83-66139-03-9; druk: ISBN 978-83-66139-02-2)
5. Nauki przyrodnicze - Część V (online: ISBN 978-83-66139-04-6; druk: ISBN 978-83-66139-05-3)
6. Nauki przyrodnicze - Część VI – Ochrona środowiska  
(online: ISBN 978-83-66139-07-7; druk: ISBN 978-83-66139-06-0)
7. Nauki medyczne i nauki o zdrowiu - Część I (online: ISBN 978-83-65917-92-8; druk: ISBN 978-83-65917-93-5)
8. Nauki medyczne i nauki o zdrowiu - Część II (online: ISBN 978-83-65917-95-9; druk: ISBN 978-83-65917-94-2)
9. Nauki techniczne i inżynierskie - Część I – Budownictwo i architektura  
(online: ISBN 978-83-66139-08-4; druk: ISBN 978-83-66139-09-1)
10. Nauki techniczne i inżynierskie - Część II (online: ISBN 978-83-66139-11-4; druk: ISBN 978-83-66139-10-7)
11. Nauki techniczne i inżynierskie - Część III (online: ISBN 978-83-66139-12-1; druk: ISBN 978-83-66139-13-8)
12. Nauki techniczne i inżynierskie - Część IV (online: ISBN 978-83-66139-15-2; druk: ISBN 978-83-66139-14-5)
13. Nauki techniczne i inżynierskie - Część V (online: ISBN 978-83-66139-16-9; druk: ISBN 978-83-66139-17-6)
14. Nauki humanistyczne i społeczne - Część I (online: ISBN 978-83-65917-83-6; druk: ISBN 978-83-65917-82-9)
15. Nauki humanistyczne i społeczne - Część II – Ekonomia, działalność gospodarcza i bankowość  
(online: ISBN 978-83-65917-84-3; druk: ISBN 978-83-65917-85-0)
16. Nauki humanistyczne i społeczne - Część III (online: ISBN 978-83-65917-86-7; druk: ISBN 978-83-65917-87-4)
17. Nauki humanistyczne i społeczne - Część IV – Pedagogika, edukacja, rodzina  
(online: ISBN 978-83-65917-89-8; druk: ISBN 978-83-65917-88-1)
18. Nauki humanistyczne i społeczne - Część V – Prawo i administracja  
(online: ISBN 978-83-65917-90-4; druk: ISBN 978-83-65917-91-1)