WYKŁADY SPECJALNE

DR HAB. SŁAWOMIR KWIECIEŃ

ANTYOKSYDACYJNE I GASTROPROTEKCYJNE WSPÓŁDZIAŁANIE TLENKU AZOTU (NO) ORAZ ASPIRYNY

AFILIACJA: Katedra Fizjologii, Wydział Lekarski, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński

Aspiryna (kwas acetylosalicylowy) jest najstarszym i najpopularniejszym niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym (NLPZ). Od dawna znane są też efekty uboczne jej stosowania, prowadzące do powstawania uszkodzeń błony śluzowej żołądka: nadżerek, a nawet wrzodów. Szkodliwe działanie aspiryny na śluzówkę żołądka ma miejsce nie tylko od strony światła żołądka, ale może być też konsekwencją działania aspiryny już wchłoniętej i przedostającej się do żołądka drogą krwi. Główny mechanizm działania aspiryny polega na blokowaniu cyklooksygenazy (COX). Efekty zastosowania aspiryny mogą wynikać z jej bezpośredniego działania cytotoksycznego, z zahamowania produkcji prostaglandyn. Interesujące jest dwoiste działanie aspiryny w organizmie w aspekcie generowania wolnych rodników tlenowych. Z jednej strony mamy cytotoksyczne działanie aspiryny: aspiryna w żołądku indukuje chemotaksję neutrofili, produkujących wolne rodniki tlenowe. Z drugiej strony aspiryna ulega zmetabolizowaniu do kwasu salicylowego. Kwas salicylowy posiada zaś zdolność inaktywowania wolnych rodników tlenowych, czego konsekwencją jest osłabienie intensywności powstawania nadtlenków lipidów. Nasz organizm prawdopodobnie posiada zdolność adaptacji do długotrwałego stosowania aspiryny. Wielokrotne podawanie aspiryny powoduje adaptację błony śluzowej żołądka, przejawiającą się zmniejszeniem liczby uszkodzeń. Zjawisko to tłumaczy się acetylacją indukowalnej cyklooksygenazy (COX-2). Tak zmodyfikowany enzym otwiera kaskadę produkcji lipoksyn. Lipoksyny zaś hamują naciek tkanek przez neutrofile, zmniejszając tym samym oksydatywne uszkodzenie tkanek. Gastroprotekcyjne działanie lipoksyn mediowane jest najprawdopodobniej przez NO. Efekty działania NO uzależnione są od jego ilości w tkankach. Małe ilości NO, na poziomie niskim, fizjologicznym, produkowane przez konstytutywną syntazę NO, wykazują działanie ochronne, gastroprotekcyjne. Wynika ono ze zwiększenia żołądkowego przepływu krwi, jak również neutralizacji wolnych rodników tlenowych. Natomiast duże ilości NO, produkowane przez indukowalną syntazę NO, obecną w makrofagach, wywołują efekt cytotoksyczny. Ze względu na efekty uboczne działania aspiryny obiektem badań stała się pochodna kwasu acetylosalicylowego, połączona wiązaniem kowalencyjnym z cząsteczką NO poprzez dołą-

czenie reszty nitroksybutylowej: NO-aspiryna. Substancja ta ma łączyć cechy inhibitora COX z właściwościami donora NO, a przez to wykazywać mniejsze skutki uboczne swego działania. Zastosowanie NO-aspiryny, w przeciwieństwie do aspiryny, zmniejsza liczbę uszkodzeń śluzówki żołądka między innymi dzięki zmniejszeniu nasilenia działania wolnych rodników tlenowych i wzrostowi aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Mechanizmy zależnej od NO gastroprotekcji związane są ze wzrostem żołądkowego przepływu krwi, zmiatania wolnych rodników tlenowych, hamowania napływu neutrofili i ich interakcji z płytkami krwi. Wymienione efekty wzmacniają integralność bariery śluzówkowej żołądka.

PROF. DR HAB. BARBARA MALAWSKA

MOŻLIWOŚĆ TERAPII CHOROBY ALZHEIMERA LEKIEM WIELOFUNKCYJNYM

AFILIACJA: Zakład Fizykochemicznej Analizy Leku, Katedra Chemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński

Alarmujące prognozy obrazujące nieustanny wzrost chorych dotkniętych niszczącą, neurodegeneracyjną chorobą Alzheimera wymagają poszukiwania skutecznych sposobów jej leczenia. Aktualnie w terapii tej choroby stosowane są jedynie leki o działaniu objawowym, trzy będące inhibitorami cholinoesteraz oraz antagonista receptorów NMDA. Od 2003 roku nie został zarejestrowany żaden nowy lek.

W poszukiwaniu potencjalnego leku przeciwko chorobie Alzheimera brana jest pod uwagę wielka liczba odkrytych celów terapeutycznych i różne strategie leczenia. Cele terapeutyczne w leczeniu choroby Alzheimera mogą być związane z leczeniem jej objawów lub przyczyn powstawania. Te ostatnie wiążą się z neurotoksycznym działaniem białek beta amyloidu, tau oraz neuroprotekcją. Złożoność choroby Alzheimera oraz poznanie wielu potencjalnych celów biologicznych spowodowały w ostatnich latach zastosowanie do poszukiwania nowego leku w chorobie Alzheimera strategii projektowania ligandu wielofunkcyjnego. Jest ona szczególnie odpowiednia dla chorób o złożonej etiologii, z wieloma czynnikami patogenetycznymi, jak przykładowo choroby neurodegeneracyjne. Jej celem jest stworzenie pojedynczej cząsteczki, która poprzez równoczesne oddziaływanie (polifarmakologia) z wieloma celami może być bardziej skuteczna aniżeli poprzez działanie z pojedynczym celem.

Strategia ta zostanie zaprezentowana na przykładzie cząsteczek ligandów wielofunkcyjnych o potwierdzonej aktywności w badaniach przedklinicznych i klinicznych. Przedstawione zostaną także wyniki badań własnych obejmujących związki o właściwościach hamujących cholinoesterazy, agregację beta amyloidu oraz o działaniu neuroprotekcyjnym.

DR HAB. AGATA PTAK-BELOWSKA, PROF. UJ

FIZJOLOGICZNA ROLA RECEPTORÓW ZWIĄZANYCH Z BIAŁKAMI G ORAZ ICH ZNACZENIE W FARMAKOTERAPII

AFILIACJA: Katedra Fizjologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński

Receptory sprzężone z białkami G, GPCR (*G protein coupled receptors*), siedmiotransbłonowe (7TM) to największa, zróżnicowana grupa białek błonowych. Są one odpowiedzialne za przekazywanie sygnałów przez dwuwarstwową błonę lipidową do miejsc efektorowych znajdujących się we wnętrzu komórki.

Receptory GPCR zbudowane są z pojedynczych łańcuchów polipeptydowych, których domenę transbłonową tworzy 7 hydrofobowych alfa-helis połączonych 3 pętlami na zewnątrz i 3 wewnątrz komórki. Karboksylowy koniec łańcucha białkowego (C-koniec) znajduje się po wewnętrznej stronie komórki, koniec aminowy (N-koniec) jest na zewnątrz komórki.

Białka G to rodzina białek biorących udział w przenoszeniu sygnałów chemicznych pochodzących z zewnątrz komórki do jej wnętrza. Ich aktywność regulowana jest przez czynniki, które kontrolują zdolność do wiązania i hydrolizy GTP do GDP. Kiedy przyłączają GTP, są aktywne, a gdy GDP, są nieaktywne. Białka te należą do grupy enzymów GTP-az. Białka G są ważnymi cząsteczkami przewodzącymi sygnał w komórce.

Istnieje ok. 800 różnych typów receptorów należących do rodziny GPCR, z których ponad połowa wykazuje potencjalne znaczenie dla przemysłu farmaceutycznego. Inhibitory współzawodniczące z ligandami w przypadku związania z receptorem GPCR hamują ścieżkę sygnału, zapobiegając zmianie konformacji, która aktywuje białko G. W farmakologii istotne znaczenie mają takie inhibitory receptorów GCPR, jak np. propranolol i cimetidina, hamujące odpowiednio receptory: adrenergiczny – β2 (βAR) i histaminowy H_2. Inne związki farmaceutyczne są ligandami, które aktywują np. receptory dopaminy i serotoniny w leczeniu choroby Parkinsona, migreny. Mogą też być odwrotnymi ligandami, które zapobiegają podstawowej czynności np. receptora GABA – związanego z pamięcią i uczeniem się.

PROF. DR HAB. MAREK SANAK

MIKRORNA W REGULACJI EKSPRESJI GENETYCZNEJ: MARKER CZY MECHANIZM CHOROBY

AFILIACJA: Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej, II Katedra Chorób Wewnętrznych im. Andrzeja Szczeklika, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński

Małą cząsteczkę RNA powstającą z transkryptu jej prekursorowego genu (*Lin-4*) odkryto w 1993 roku jako regulator stadiów rozwojowych u nicienia. W latach 2001–2004 wykazano, że ekspresja genetyczna może podlegać szybkim zmianom, niezależnym od tempa transkrypcji. Odbywa się to przez wybiórczą degradację mRNA lub hamowanie jego translacji. Mechanizm ten okazał się uniwersalny dla świata roślin i zwierząt. Liczba dobrze poznanych cząsteczek mikroRNA zmieniających ekspresje genów kodujących białka u człowieka wynosi blisko 2000. Odkryto dalszych 2500 kandydatów dla mikroRNA, spośród których taką funkcję udokumentowano w dalszym 1000 cząsteczek obecnych w komórkach człowieka. Cechą charakterystyczną mikroRNA jest zmiana liczby tych cząsteczek zarówno w czasie rozwoju organizmu, jak i różnicowania indywidualnych komórek. Przykładowo, znanych jest ponad 400 mikroRNA o ekspresji swoistej wyłącznie dla neuronów albo komórek nerek. Ekspresja mikroRNA ulega zmianom w komórkach nowotworowych. Jest to przede wszystkim przejaw utraty kontroli genetycznej towarzyszącej ich złośliwieniu. Stąd intensywne poszukiwania markerów mikroRNA (onkomirów), których wykrycie ułatwiłoby diagnostykę tych chorób. Jednoniciowe RNA jest bardzo nietrwałą i podatną na degradację cząsteczką. Jednak system transportu wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego, polegający na wiązaniu mikroRNA z białkami nośnikowymi oraz ich obecnością w mikrocząstkach komórkowych, powoduje, że względnie łatwo jest mierzyć mikroRNA w płynach ustrojowych i preparatach tkankowych. Przedstawione zostaną dwa przykłady badań własnych, w których ekspresja mikroRNA korelowała z procesem choroby, będąc nie tylko jej markerem, lecz również ważnym ogniwem mechanizmu.

PROF. DR HAB. JANUSZ RYŚ

BADANIA ABERRACJI CHROMOSOMOWYCH I EKSPRESJI WYBRANYCH GENÓW W MATERIALE TKANKOWYM

AFILIACJA: Zakład Patomorfologii Nowotworów, Centrum Onkologii, Instytut im M. Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie

Od ponad 20 lat badania cytogenetyczne i wybrane techniki molekularne stanowią integralną część analiz morfologicznych wykonywanych na potrzeby diagnostyki nowotworów. Dzięki nim możliwe było opisanie nowych jednostek morfologiczno-klinicznych, a także wprowadzenie testów laboratoryjnych służących selekcji chorych do tzw. leczenia celowanego/spersonalizowanego.

Początkowo badania cytogenetyczne i molekularne wykorzystywano głównie w diagnostyce nowotworów układu hematopoetycznego (białaczki) i chłonnego (nieziarnicze chłoniaki), a także mięsaków. Z czasem znalazły one zastosowanie także w diagnostyce nowotworów nabłonkowych, w szczególności ślinianek, tarczycy, nerek, płuc i sutka. W szeregu wspomnianych nowotworów komórki guza charakteryzują się występowaniem powtarzających się i nieprzypadkowych aberracji chromosomowych, prowadzących do powstania genów fuzyjnych. Białkowe produkty tych genów pełnią funkcję onkoprotein stymulujących proliferację komórek i czynników transkrypcyjnych, decydujących o różnicowaniu się komórek. Na przykład wśród mięsaków tkanek miękkich tego typu zmiany obserwuje się w ok. 25% guzów (*T-sarcomas*).

Klasyczne badania cytogenetyczne mają ograniczone zastosowanie w rutynowej diagnostyce morfologicznej nowotworów, gdyż wymagają nieutrwalonego materiału cytologicznego bądź tkankowego, pobranego dodatkowo w warunkach sterylnych. Tymczasem molekularne substytuty klasycznych technik cytogenetycznych pozwalają także na analizę materiału utrwalonego w alkoholu lub formalinie i zatopionego w blokach parafinowych. Do wspomnianych metod zaliczane jest m.in. badanie techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z użyciem sond typu *break apart probes*. W badaniu tym wykorzystywane jest zjawisko pękania chromosomów w miejscu lokalizacji genów uczestniczących w tworzeniu genu fuzyjnego. Ma ono szereg zalet w porównaniu z klasycznymi badaniami cytogenetycznymi i badaniami molekularnymi techniką PCR. Pozwala na analizę nawet pojedynczych komórek nowotworowych zarówno w materiale tkankowym, jak i w rozmazach cytologicznych, umożliwia identyfikację

rodzaju komórek wykazujących aberrację chromosomową (badanie *in situ*) oraz cechuje się większą czułością (ze względu na wykorzystanie sond DNA) w przypadku badania materiału archiwalnego. Co najistotniejsze, badanie techniką FISH z użyciem sond typu *break apart probes* pozwala na wykrycie w trakcie jednego testu laboratoryjnego guzów prezentujących różne warianty genów fuzyjnych.

Stale rosnąca liczba komercyjnie dostępnych sond umożliwia precyzyjną diagnostykę coraz większej liczby nowotworów. Dla przykładu, badanie z użyciem sondy *TFE3 – break apart probe* pozwala na identyfikację opisanego niedawno raka nerki z translokacją fragmentu chromosomu X (Xp11.2 *translocation renal cell carcinoma*), a test z użyciem sondy *ETV6 break apart probe* na rozpoznanie raka wydzielniczego (*secretory carcinoma*) sutka lub ślinianek. W gronie złośliwych nowotworów o różnicowaniu mezenchymalnym badania FISH pozwalają na ustalenie ostatecznego rozpoznania m.in. mięsaka maziówkowego, odmiany pęcherzykowej mięsaka mięśniowego prążkowano-komórkowego, mięsaka stromalnego (*low-grade stroma sarcoma*) czy wrodzonego włókniakomięsaka niemowląt (*infantile fibrosarcoma*). Technika FISH umożliwia także identyfikację zwielokrotnienia liczby kopii genów biorących udział w powstawaniu raków sutka z ekspresją receptora HER2, dobrze zróżnicowanych i odróżnicowanych tłuszczakomięsaków (amplifikacja *MDM2*) i nerwiaka zarodkowego (*neuroblastoma*) (amplifikacja *N-MYC*).

Białkowe produkty genów uczestniczących w powstawaniu genów fuzyjnych można identyfikować metodami immunohistochemicznymi przy użyciu specyficznych przeciwciał, np. dodatnia reakcja jądrowa z przeciwciałem przeciwko białkowemu produktowi genu *TFE3* pozwala na potwierdzenie rozpoznania mięsaka pęcherzykowego tkanek miękkich (*alveolar soft part sarcoma*) oraz wspomnianej wcześniej szczególnej odmiany raka nerki. W oparciu o badania immunohistochemiczne możliwe jest również rozpoznanie nowotworów, których rozwój związany jest z utratą wybranych genów supresorowych, np. badanie utraty ekspresji białka INI1 w mięsaku nabłonkowatym i w złośliwych guzach rhabdoidnych. W ostatnich latach pojawiły się również nowe przeciwciała skierowane przeciwko białkowym produktom genów specyficznych dla poszczególnych nowotworów, które zostały zidentyfikowane w oparciu o badania z użyciem mikromacierzy DNA (np. białka TLI-1, AP2β, APO-D wykorzystywane w diagnostyce odpowiednio: mięsaka maziówkowego, guzów typu *alveolar rhabdomyosarcoma* oraz włókniakomięsaka skóry). Badania te mogą być substytutem badań cytogenetycznych lub badań molekularnych.