

ZESZYTY NAUKOWE TOWARZYSTWA DOKTORANTÓW
UNIwersytetu Jagiellońskiego

RADA NAUKOWA

PROF. DR HAB. MARIA FLIS
PROREKTOR UNIwersYTETU JagIELLOŃSKIEGO DS. ROZWOJU

PROF. DR HAB. ANDRZEJ MANIA
PROREKTOR UNIwersYTETU JagIELLOŃSKIEGO DS. DYDAKTYKI

PROF. DR HAB. BOGDAN SZLACHTA
DZIEKAN WYDZIAŁU STUDIÓW MIĘDZYNARODOWYCH I POLITYCZNYCH UJ

PROF. DR HAB. KATARZYNA KIEĆ-KONONOWICZ
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY, UJ COLLEGIUM MEDICUM
KIEROWNIK KATEDRY TECHNOLOGII I BIOTECHNOLOGII ŚRODKÓW LECZNICZYCH

PROF. DR HAB. MARTA KUDELSKA
WYDZIAŁ FILOZOFICZNY UJ
KIEROWNIK KATEDRY PORÓWNAWCZYCH STUDIÓW CYWILIZACJI

PROF. DR HAB. JACEK SKŁADZIEN
WYDZIAŁ LEKARSKI, UJ COLLEGIUM MEDICUM
KIEROWNIK KATEDRY I KLINIKI OTOLARYNGOLOGII

PROF. DR HAB. ANDRZEJ KOTARBA
WYDZIAŁ CHEMII UJ
KIEROWNIK STUDIÓW DOKTORANCKICH

PROF. DR HAB. KAROL MUSIOŁ
WYDZIAŁ FIZYKI, ASTRONOMII I INFORMATYKI STOSOWANEJ UJ

DR HAB. LESZEK SOSNOWSKI
WYDZIAŁ FILOZOFICZNY UJ, PRODZIEKAN DS. STUDENCKICH

ZESZYTY NAUKOWE TOWARZYSTWA DOKTORANTÓW
UNIwersytetu Jagiellońskiego

NAUKI ŚCISŁE

NUMER 5 (2/2012)



KRAKÓW 2012

Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ
ul. Straszewskiego 25/3, 31-113 Kraków

Redaktor naczelny:
Marcin Lubecki

Zastępczyni redaktora naczelnego:
Paulina Tendera

Sekretarz redakcji:
Rafał Opulski

Redaktorzy tomu:
Anna Bogdali (red. prowadząca),
Anna Sulima, Tomasz Wróbel

Recenzenci artykułów:
prof. dr hab. Maria Nowakowska
dr hab. Rafał Chrzan
dr hab. Wojciech Fiałkowski
dr hab. Sławomir Kwiecień
dr hab. Anna Wiśniewska-Becker
dr hab. Robert Wołak
dr Joanna Chłopicka
dr Zdzisław Pogoda
dr Sebastian Polak
dr Robert Sitarz
dr Piotr Sura
dr Anna Włodarczyk

Redakcja językowa i korekta:
Katarzyna Migdał (red. prowadząca),
Magdalena Hoły-Łuczaj, Jakub Rogulski,
Dagmara Zajac

Skład:
Marcin Lubecki

Projekt okładki:
Szymon Drobnik

Obsługa strony internetowej:
Damian Marchewka

Współpraca wydawnicza:
Wydawnictwo LIBRON – Filip Lohner
ul. Ujejskiego 8/1, 30-102 Kraków

SPIS TREŚCI

Krzysztof Nesterowicz	7
Research on the Effectiveness of Transferring Skills with the Use of e-Learning in the Precision of Blood Pressure Measurement Conducted by Pharmacists	
Robert Sitarz, Małgorzata Kolasieńska-Bzoma, Magdalena Skórzewska, Wojciech P. Polkowski, Ryszard Maciejewski	19
Cyklooksygenaza-2 i jej rola w kancerogenezie	
Marta B. Kaczor	41
Zmiany zachodzące w organizmie płazów pod wpływem jonów ołowiu	
Magdalena Łukasiewicz	57
Układy liposom-polimer jako nośniki białek zakotwiczonych przez GPI	
Katarzyna Szewczyk, Walentyna Balwierz	77
Metody detekcji przerzutów komórek neuroblastoma do szpiku kostnego	

PRACE INTERDYSCYPLINARNE

Ada Pałka	89
Matematyka w sztuce – anamorfoza	
Noty o autorach	99

KRZYSZTOF NESTEROWICZ

(UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI)

RESEARCH ON THE EFFECTIVENESS OF TRANSFERRING SKILLS WITH THE USE OF E-LEARNING IN THE PRECISION OF BLOOD PRESSURE MEASUREMENT CONDUCTED BY PHARMACISTS

INTRODUCTION

Internet technologies have fundamentally altered the technological and economic landscapes so radically that it is now possible to make quantum leaps in the use of technology for learning. Yet there is also a danger. If we focus too much on the technology itself and not enough on how well it is used, we will continue to fall short. But if we neglect the power of the Internet, we will never get off the ground. In the end, successful Internet-enabled learning, or „e-learning”, depends on building a strategy that optimizes the technology within an organizational culture that is ready and willing to use it.¹

E-learning systems have become important tools in the process of continuing education of pharmacists and other healthcare specialists. In Poland the continuing education of graduated pharmacists is obligatory in order to keep their professional license valid.² Nowadays more than 70% of Polish professionally active pharmacists take part in courses carried out with the use of e-learning platforms. There are five available and independent from each other online systems offering such courses:

¹ M. J. Rosenberg, *E-learning: Strategies for Delivering Knowledge in the Digital Age*, McGraw-Hill Professional 2001, s. 16–17.

² J. Brandys, A. Mendyk et al., *An e-Learning System for Pharmacist Continuing Education in Poland*, *Pharmacy Education*, March 2006, 6 (1), s. 65–70.

- e-duk@cja as a common project of the Local Pharmaceutical Chamber and Faculty of Pharmacy Jagiellonian University Medical College in Krakow,
- farmacja.edu.pl created by educators from the Faculty of Pharmacy Warsaw Medical University,
- e-umed.lodz.pl provided by Medical University in Lodz,
- Platform of Modern Education of Polish Pharmaceutical Society,
- e-farmacja.net which is the social e-learning portal for pharmacists and pharmacy technicians run by Local Pharmaceutical Chamber in Krakow.

E-duk@cja is the largest system dedicated to pharmacy continuing education.³ It was launched in February 2005. The aim of the e-duk@cja project is to develop a distance learning system for the life-long educational needs of pharmacists.⁴ For today e-duk@cja has more than 14,000 active users, about 20 courses, nearly 60 credits to gain, ca. 600 independent users' visits daily and above 2 million hits of the website per year.⁵

The increasing popularity of e-learning as the way of continuing education requires investigation and evaluation of the quality and efficacy of this method of education. In the below study we focused on the transfer of skills with the use of distance learning methods.

Blood pressure measurement is the basis for the diagnosis, management, treatment, epidemiology and research of hypertension, and the decisions affecting these aspects of hypertension will be influenced, for better or worse, by the accuracy of measurement.⁶

THE AIM OF THE STUDY

No matter which measurement device is used, blood pressure will always be a variable haemodynamic phenomenon that is influenced by many factors, which include the circumstances of measurement itself, emotion, exercise, meals, tobacco, alcohol, temperature, respiration, bladder distension and pain; blood pressure is also influenced by age, race and diurnal variation, usually being lowest during sleep.⁷ It is not always possible to modify these factors but we can

³ e-dukacja.pl [homepage on the Internet], © e-dukacja.pl 2004–2012 centrum farmaceutycznych szkoleń online. Available at: <http://www.e-dukacja.pl/> [11.10.2012].

⁴ A. Mendyk, M. Polak et al., *System e-duk@cja wczoraj, dziś i jutro*, „Aptekarz Polski” January 2009, no. 29/7, s. 7–9.

⁵ K. Nesterowicz, A. Mendyk et al., *E-Learning in Continuing Pharmaceutical Education in Poland*, „Bio-Algorithms and Med-Systems” Vol. 7, No. 13, 2011, s. 11–15.

⁶ E. O'Brien et al., *Practice Guidelines of the European Society of Hypertension for Clinic, Ambulatory and Self Blood Pressure Measurement*, „Journal of Hypertension” 2005, 23, s. 697–701.

⁷ Ibidem.

minimise their effect by taking them into account in reaching a decision as to the relevance or otherwise of a particular blood pressure measurement.⁸ One needs to acquire special skills in order to measure blood pressure properly.

The aim of the study was to compare the effectiveness of an e-course to a stationary course provided for pharmacists based on the transfer of skills related to the proper measurement of blood pressure by mechanical sphygmomanometer with aneroid manometer and stethoscope.

METHODS

The course “Right Monitoring of Blood Pressure for Pharmacists” was provided as an e-learning course for pharmacy students and pharmacists from the investigated group and as a stationary course for attendees from the control group.

The investigated group consisted of pharmacy students and pharmacists trained by e-learning course provided on the platform VBoard and the control group consisted of pharmacy students and pharmacists taught in a stationary way. The participation in the research was voluntary and assignment to both groups was randomized. The access to the investigated group was open for pharmacy students and pharmacists registered on the e-learning platform VBoard. The stationary and e-learning course took place in February 2009. Participants from the control group were trained how to measure blood pressure by physician. There was a lecture prepared for attendees from the investigated and control group and 8 minutes-long schooling movie. Participants from both groups needed to pass the preliminary test. There were 10 questions in the test and one needed to answer correct on at least 6, which was 60% of positive answers, to be included in the course and research.⁹

There were 5 pharmacy students and pharmacists in the investigated group and 6 pharmacy students and pharmacists in the control one who completed the course and measurements. Women were the majority in the investigated group: 4 women out of 5 attendees (80%) and in the control one 3 women out of 6 participants (50%).

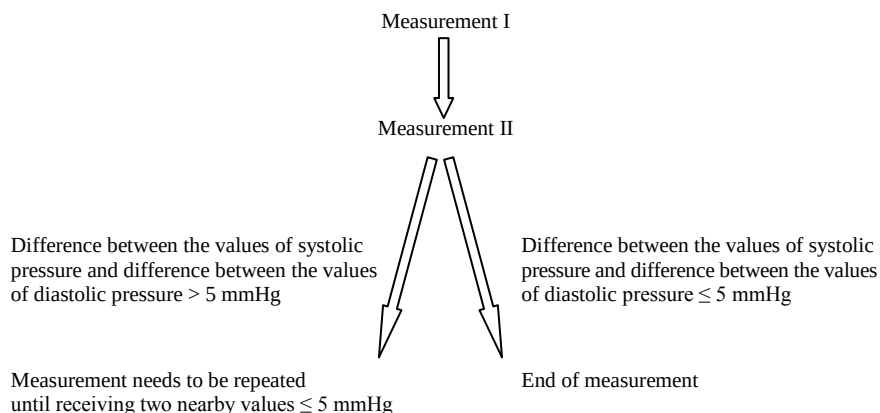
The material of both courses was the same in principles and the difference lied in the communication channel. Each participant who completed the course successfully worked later with one patient who was coming each Tuesday and Thursday in the period of four weeks to check his/her blood pressure. Each measurement was done twice at one meeting and the difference between the values of systolic pressure by two measurements following one after another could not be higher than 5 mmHg, otherwise the measurement needed to be

⁸ E. O'Brien, J. Petrie et al, *Blood Pressure Measurement: Recommendations of the British Hypertension Society*, 3rd ed., British Medical Journal Publishing Group, London 1997.

⁹ VBoard [homepage on the Internet], VBoard Copyright © 2004–2012. Available at: <http://papaver.farmacja.cm-uj.krakow.pl/vboard/> [11.10.2012].

repeated until the difference between two of them was lower or equal 5 mmHg. The same condition was kept also for the diastolic pressure (Fig. 1). This allowed to monitor the precision of measurements done by attendees from both groups and compare it to each other. The results of measurements were written down in the special form which was prepared in advance.

Figure 1. The procedure of right measurement of blood pressure



Reference: author's.

All attendees were supposed to follow guidelines of the European Society of Hypertension for clinic, ambulatory and self blood pressure measurement described below:¹⁰

Attitude of observer

Before taking the blood pressure, the observer should be in a comfortable and relaxed position, and should not rush the procedure, otherwise the cuff may be deflated too rapidly, resulting in underestimation of systolic and overestimation of diastolic pressures.

Attitude of patient

Patients should be encouraged to relax and be advised that neither they nor the observer should talk to each other for the few minutes before and during the blood pressure measurement.

¹⁰ E. O'Brien et al., *Practice Guidelines...*, op. cit., s. 697–701.

Posture of subject

Blood pressure should be measured with the individual sitting with back support, legs uncrossed and the arm supported at heart level.

The cuff and bladder

If a blood pressure measuring device is dependent on cuff occlusion of the arm, it will be prone to the inaccuracy induced by miscuffing, whereby a cuff contains a bladder that is either too long or too short relative to arm circumference (Table 1). A review of the literature on the century-old controversy relating to the error that may be introduced to blood pressure measurement by using a cuff with a bladder of inappropriate dimensions for the arm for which it is intended has shown that miscuffing is a serious source of error.¹¹

Table 1. Recommended bladder dimensions for adults

British Hypertension Society	
Standard cuff	Bladder 12 × 26 cm for the majority of adult arms
Large cuff	Bladder 12 × 40 cm for obese arms
Small cuff	Bladder 12 × 18 cm for lean adult arms and children
American Heart Association	
Small adult cuff	Bladder 10 × 24 cm for arm circumference 22–26 cm
Adult cuff	Bladder 13 × 30 cm for arm circumference 27–34 cm
Large adult cuff	Bladder 16 × 38 cm for arm circumference 35–44 cm
Adult thigh cuff	Bladder 20 × 42 cm for arm circumference 45–52 cm

Reference: E. O'Brien et al., *Practice Guidelines of the European Society of Hypertension for Clinic, Ambulatory and Self Blood Pressure Measurement*, "Journal of Hypertension" 2005, 23, s. 697–701.

¹¹ Idem, *A Century of Confusion: Which Bladder for Accurate Blood Pressure Measurement?*, "Journal of Human Hypertension" 1996, 10, s. 565–572.

Observer error

Observer error, which can greatly affect the accuracy of measurement, may be the result of systematic error, terminal digit preference or observer prejudice or bias.

Aneroid sphygmomanometers

The aneroid manometer is not generally accurate. An inflation/deflation system, an occluding bladder encased in a cuff, and auscultation using a stethoscope are features common to this device, any of which may introduce error. Aneroid sphygmomanometers register pressure through a bellows and lever system, which may become inaccurate with everyday use, usually leading to false low readings.¹²

Performing auscultatory measurement:¹³

- The observer should ensure that the manometer is no more than 1 metre away so that the scale can be read easily, that the bladder dimensions are accurate, and that, if the bladder does not completely encircle the arm, its centre is over the brachial artery.
- The stethoscope should be placed gently over the brachial artery at the point of maximal pulsation; the cuff should then be inflated rapidly to about 30 mmHg above the palpated systolic pressure and deflated at a rate of 2–3 mmHg per second.
- Systolic blood pressure is the first appearance of faint, repetitive, clear tapping sounds that gradually increase in intensity.
- Diastolic blood pressure is at the point of disappearance of sounds or the first mmHg value at which the sounds are no longer audible (phase V); when sounds persist down to zero, muffling of sounds (phase IV) should be recorded for diastolic pressure.

RESULTS

11 pharmacy students and pharmacists from both groups passed the preliminary online test on the platform VBoard¹⁴ with the score of at least 60% correct answers, took part in the course and completed the measurement phase.

¹² Idem, *Practice Guidelines...*, op. cit., s. 697–701.

¹³ Ibidem.

¹⁴ VBoard [homepage on the Internet], VBoard Copyright © 2004–2012. Available at: <http://papaver.farmacja.cm-uj.krakow.pl/vboard/> [11.10.2012].

Investigated group

Each from 5 pharmacy students and pharmacists did the measurement of blood pressure following the instructions presented at the course before for his/her assigned patient. The measurement needed to be repeated 6 times in the group because the nearby values of systolic pressure or nearby values of diastolic pressure were bigger than 5 mmHg (see Fig. 1).

Control group

Also here the conditions were the same like for the investigated group. There were 6 pharmacy students and pharmacists. The measurement needed to be repeated 7 times because of the difference between nearby values of systolic or diastolic pressure bigger than 5 mmHg.

Altogether in both groups took place 233 measurements during the period of four weeks. The difference in the precision of measurement between both groups was analyzed by t-Student Test.¹⁵ The computer programme Statistica provided by Statsoft© was used for analysis of results.¹⁶

The received p-value is 0.9376 and is higher from the chosen statistical significance level 0.05. Therefore we cannot exclude the hypothesis H_0 . Basing on chosen probes and chosen statistical significance level the difference in the precision of the measurement between both groups was not observed.¹⁷

CONCLUSION

There was not statistically significant difference in precision of blood pressure measurement between the investigated and control group. The purpose of both courses was to transfer and check skills related to the proper measurement of blood pressure with the auscultatory device. Participants schooled by e-learning and stationary course showed the same level of preparation in measuring blood pressure of their patients.

DISCUSSION

With few exceptions, hundreds of media comparison studies have shown no differences in learning (Clark, 1994; Dillon, Gabbard, 1998). A metaanalysis by Bernard et al. (2004) integrating research studies that compared learning from

¹⁵ J. O'Connor, J. Robertson et al., *Student's t-Test*, MacTutor History of Mathematics Archive, University of St Andrews. [Online]. Available at: <http://www-history.mcs.st-andrews.ac.uk/Biographies/Gosset.html> [11.10.2012].

¹⁶ Statsoft® [homepage on the Internet], © Statsoft Polska 1995–2012. Available at: <http://www.statsoft.pl/> [11.10.2012].

¹⁷ M. Sobczyk, *Statystyka. Podstawy teoretyczne, przykłady – zadania*, UMCS, May 1998.

electronic distance education to learning from traditional classroom instruction indicates no practical differences in learning between face-to-face and electronic distance learning. A review of online learning by Tallent-Runnels, Thomas, Lan, Cooper, Ahern, Shaw and Liu (2006) concurs:¹⁸ “Overwhelming evidence has shown that learning in an online environment can be as effective as that in traditional classrooms. Second, students’ learning in the online environment is affected by the quality of online instruction. Not surprisingly, students in well-designed and well-implemented online courses learned significantly more and more effectively than those in online courses where teaching and learning activities were not carefully planned and where the delivery and accessibility were impeded by technology problems.”

Two reviews have investigated learning styles with special focus on health science education. Romanelli stresses the lack of a conceptual framework for both learning style theory and measurement and conclude that faculty members should make concentrated efforts to teach in a multi style fashion.¹⁹ Cook concludes that further research in web-based learning could clarify the feasibility and effectiveness of assessing and adapting to learning.²⁰ Others have criticized the use of learning styles as predictors of learning preferences with the argument that there are more important factors involved in the learning process. Some work has been done since Cooks review was published, but there are only a few papers relevant for medical web-based education.²¹

The main finding of this study is the proof of comparable effectiveness in transferring skills by e-learning and stationary methods. It was verified with the focus on precision of measurements in both groups for the period of four weeks.

¹⁸ C. Ruth Clark, E. Richard Mayer, *e-Learning and the Science of Instruction: Proven Guidelines for Consumers and Designers of Multimedia Learning*, John Wiley & Sons, 2011, s. 20.

¹⁹ F. Romanelli, E. Bird, M. Ryan, *Learning styles: a review of theory, application, and best practices*, “American Journal of Pharmacy Education”, February 2009, 19, 73 (1), s. 9.

²⁰ D. A. Cook, *Learning and cognitive styles in web-based learning: theory, evidence, and application*, “Academic Medicine: Journal of the Association of American Medical Colleges” March 2005, 80 (3), s. 266–278.

²¹ D. A. Cook, W.G. Thompson, K.G. Thomas, M.R. Thomas, *Lack of interaction between sensing-intuitive learning styles and problem-first versus information-first instruction: a randomized crossover trial*, “Advances in Health Sciences Education: Theory and Practice” March 2009, 14 (1), s. 79–90, epub 2007 Nov 24; D. A. Cook, W. G. Thompson, K. G. Thomas, M. R. Thomas, V. S. Pankratz, *Impact of self-assessment questions and learning styles in Web-based learning: a randomized, controlled, crossover trial*, “Academic Medicine: Journal of the Association of American Medical Colleges” March 2006, 81 (3), s. 231–238; J. A. McNulty, B. Espiritu, M. Halsey, M. Mendez, *Personality preference influences medical student use of specific computer-aided instruction (CAI)*, “BMC Medical Education” 2006, 6, s. 7; T. Brown et al., *Are learning style preferences of health science students predictive of their attitudes towards e-learning?*, “Australasian Journal of Educational Technology” 2009, 25 (4), s. 524–543.

It was proven statistically that there were not significant differences between the investigated and control group.

The study is innovative in the way that it focuses on evaluating the effectiveness of e-learning in transferring skills. In the available literature there are many evidences of studies conducted on pharmacy continuing education related with the transfer of knowledge and only a few focused on transferring skills and later verifying obtained ones by participants. Therefore there is the need to conduct further researches on that matter.

Among some studies there is one focused on transferring skills by e-learning. The research was conducted in 2007 at the Capella University by Janet C. Craig where the efficacy of e-learning course in providing chosen skills was proved as successful.²²

Traditionally, all the training classes have been taught in a face-to-face classroom. Within recent years, most organizations have acquired informational technology for business purposes. Now, the question arises, will the use of this technology for training effectively and efficiently enable employees to transfer the skills they are taught to the workplace?²³

Larger for-profit industries, especially those with a multi-national workforce that have moved their orientation and new hire training online seem to have been successful. Some have established in-house e-learning universities to deliver a large portion of their training. Well known companies such as The Home Depot, BMW of North America, The Hartford, and Black and Decker Corporation have very successfully implemented e-learning and regard it as a change initiative that has the potential to impact business results.²⁴

ABSTRACT

E-learning is widespread among pharmacists who take part in the continuing education courses. The fast development of e-learning platforms which provide educational courses has been noted. There is a need of standardization and validation of distance learning courses, especially as they have started to be recognized and accredited by continuing pharmacy education centres, pharmaceutical societies, chambers or other institutions which supervise the continuing education process.

The study is focused on exploring the transfer of skills related to the proper measurement of blood pressure by mechanical sphygmomanometer with aneroid manometer and stethoscope. The transfer of skills takes place in the research by two learning methods: e-learning and stationary course. Their effectiveness is compared to each other.

²² J. C. Craig, *E²: Efficient and Effective e-Learning*, A Dissertation Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Philosophy, Capella University, October 2007.

²³ Ibidem.

²⁴ Ibidem.

The received p-value from the analysis of the precision of measurement in both groups is 0.9376. It is higher from the established statistical significance level 0.05. Therefore the hypothesis H_0 is not excluded. The verified hypothesis H_0 assumes that the difference between analyzed parameters from both samples is null:²⁵

$$H_0: \Theta_1 = \Theta_2$$

There is not observed any difference in precision of measuring blood pressure between both groups with established statistical significance level 0.05. E-learning shows to be an effective tool not only in transferring knowledge but also in obtaining special skills needed for pharmacists in their daily work.

STRESZCZENIE

E-learning jest szeroko rozpowszechniony wśród farmaceutów, którzy biorą udział w szkoleniach ciągłych. Zauważalny jest szybki rozwój platform e-learningowych, które oferują kursy edukacyjne. Zachodzi potrzeba standaryzacji i walidacji kursów nauczania zdalnego, szczególnie od kiedy zaczęły być uznawane i akredytowane przed centra edukacji farmaceutycznej, towarzystwa farmaceutyczne, izby i inne instytucje, które nadzorują proces szkoleń ciągłych.

Badanie jest skoncentrowane na ocenie przekazywania umiejętności związanych z właściwym pomiarem ciśnienia krwi przez ciśnieniomierz mechaniczny z powietrznym mankietem i stetoskopem. Przekazywanie wiedzy zachodzi w badaniu dwoma metodami nauczania: w ramach e-learningu i kursu stacjonarnego. Efektywność tych metod jest porównywana ze sobą.

Otrzymana wartość p z analizy precyzji pomiaru w obu grupach wynosi 0,9376. Jest to wyższa wartość od przyjętego poziomu istotności statystycznej równego 0,05. Nie obserwuje się różnicy w precyzji pomiaru ciśnienia krwi między obiema grupami przy przyjętej wartości poziomu istotności statystycznej 0,05. Nie ma powodu do odrzucenia hipotezy H_0 . Weryfikowana hipoteza H_0 zakłada, że różnica między analizowanymi parametrami z obu prób wynosi zero:²⁶

$$H_0: \Theta_1 = \Theta_2$$

E-learning okazuje się skutecznym narzędziem nie tylko do przekazywania wiedzy, ale również do uzyskiwania specjalnych umiejętności przez farmaceutów w ich codziennej pracy.

REFERENCES

- 1 Zieliński R., *Siedem wykładów wprowadzających do statystyki matematycznej*, Warszawa 2004. [Online]. Available at: <http://www.impan.gov.pl/~rziel/7ALL.pdf> [07.12.2012].
- 2 Rosenberg M. J., *E-learning: Strategies for Delivering Knowledge in the Digital Age*, McGraw-Hill Professional, 2001, s. 16–17.

²⁵ R. Zieliński, *Siedem wykładów wprowadzających do statystyki matematycznej*, Warszawa 2004. [Online]. Available at: <http://www.impan.gov.pl/~rziel/7ALL.pdf> [07.12.2012].

²⁶ Ibidem.

- 3 Brandys J., Mendyk A. et al., *An e-Learning System for Pharmacist Continuing Education in Poland*, *Pharmacy Education*, March 2006, 6 (1), s. 65–70.
- 4 e-dukacja.pl [homepage on the Internet], © e-dukacja.pl 2004–2012 centrum farmaceutycznych szkoleń on-line. Available from: <http://www.e-dukacja.pl/> [11.10.2012].
- 5 Mendyk A., Polak M. et al., *System e-dukacja wczoraj, dziś i jutro*, „Aptekarz Polski” January 2009, no. 29/7, s. 7–9.
- 6 Nesterowicz K., Mendyk A. et al., *E-Learning in Continuing Pharmaceutical Education in Poland*, “Bio-Algorithms and Med-Systems” Vol. 7, No. 13, 2011, s. 11–15.
- 7 O’Brien E. et al., *Practice Guidelines of the European Society of Hypertension for Clinic, Ambulatory and Self Blood Pressure Measurement*, “Journal of Hypertension” 2005, 23, s. 697–701.
- 8 O’Brien E., Petrie J. et al, *Blood Pressure Measurement: Recommendations of the British Hypertension Society*, 3rd ed., British Medical Journal Publishing Group, London 1997.
- 9 VBoard [homepage on the Internet], VBoard Copyright © 2004–2012. Available at: <http://papaver.farmacja.cm-uj.krakow.pl/vboard/> [11.10.2012].
- 10 O’Brien E., *A Century of Confusion: Which Bladder for Accurate Blood Pressure Measurement?*, “Journal of Human Hypertension” 1996, 10, s. 565–572.
- 11 O’Connor J., Robertson J. et al., *Student’s t-Test, MacTutor History of Mathematics Archive*, University of St Andrews. [Online]. Available at: <http://www-history.mcs.st-andrews.ac.uk/Biographies/Gosset.html> [11.10.2012].
- 12 Statsoft® [homepage on the Internet], © Statsoft Polska 1995–2012. Available from: <http://www.statsoft.pl/> [11.10.2012].
- 13 Sobczyk M., *Statystyka. Podstawy teoretyczne, przykłady – zadania*, UMCS, May 1998.
- 14 Clark C. Ruth, Mayer E. Richard, *e-Learning and the Science of Instruction: Proven Guidelines for Consumers and Designers of Multimedia Learning*, John Wiley & Sons, 2011, s. 20.
- 15 Romanelli F., Bird E., Ryan M., *Learning styles: a review of theory, application, and best practices*, “American Journal of Pharmacy Education”, February 2009, 19, 73 (1), s. 9.
- 16 Cook D. A., *Learning and cognitive styles in web-based learning: theory, evidence, and application*, “Academic Medicine: Journal of the Association of American Medical Colleges” March 2005, 80 (3), s. 266–278.
- 17 Cook D. A., Thompson W.G., Thomas K.G., Thomas M.R., *Lack of interaction between sensing-intuitive learning styles and problem-first versus information-first instruction: a randomized crossover trial*, “Advances in Health Sciences Education: Theory and Practice” March 2009, 14 (1), s. 79–90, epub 2007 Nov 24.
- 18 Cook D. A., Thompson W. G., Thomas K. G., Thomas M. R., Pankratz V. S., *Impact of self-assessment questions and learning styles in Web-based learning: a randomized, controlled, crossover trial*, “Academic Medicine: Journal of the Association of American Medical Colleges” March 2006, 81 (3), s. 231–238.
- 19 McNulty J. A., Espiritu B., Halsey M., Mendez M., *Personality preference influences medical student use of specific computer-aided instruction (CAI)*, “BMC Medical Education” 2006, 6, s. 7.
- 20 Brown T. et al., *Are learning style preferences of health science students predictive of their attitudes towards e-learning?*, “Australasian Journal of Educational Technology” 2009, 25 (4), s. 524–543.
- 21 Craig J.C., *E²: Efficient and Effective e-Learning*, A Dissertation Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Philosophy, Capella University, October 2007.

ROBERT SITARZ, MAŁGORZATA KOLASIŃSKA-BZOMA,
MAGDALENA SKÓRZEWSKA, WOJCIECH P. POLKOWSKI,
RYSZARD MACIEJEWSKI

(UNIwersytet Medyczny w Lublinie,
Uniwersyteckie Centrum Medyczne w Utrechcie)

CYKLOOKSYGENAZA-2 I JEJ ROLA W KANCEROGENEZIE

CHARAKTERYSTYKA ENZYMÓW COX

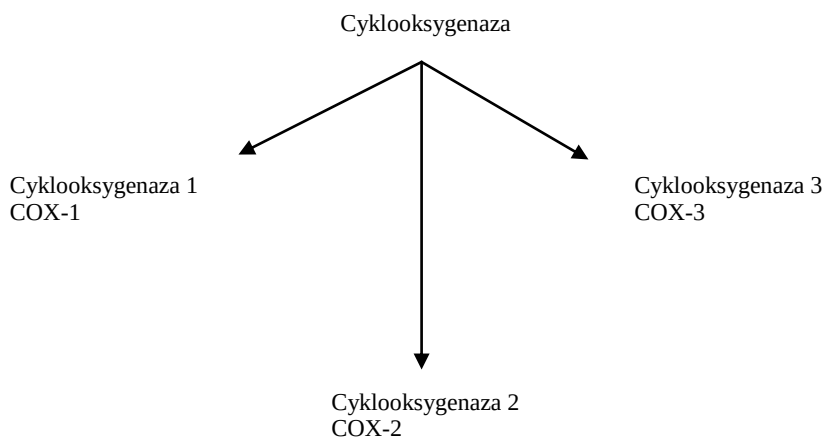
Cyklooksygenaza (ang. *cyclooxygenase*) uczestniczy w wielu ważnych fizjologicznych i patologicznych procesach w organizmie ludzkim¹ i z tego powodu jest przedmiotem intensywnych prac badawczych². Cyklooksygenaza, zwana syntazą prostaglandyny H, jak również syntazą cyklicznego nadtlenu prostaglandynowego (PGHS), jest podstawowym enzymem katalizującym przemianę kwasu arachidonowego do prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanów³. W organizmie ludzkim występuje w postaci dwóch izoform – konstytutywnej cyklooksygenazy-1 (COX-1) i indukowanej cyklooksygenazy-2 (COX-2)⁴. Niedawno wykryto również istnienie trzeciej izoformy – cyklooksygenazy-3 (COX-3)⁵.

¹ N. V. Chandrasekharan, D. L. Simmons, *The cyclooxygenases*, „Genome Biology” 2004, nr 5 (9), s. 241.

² F. Burdan, A. Chalas, J. Szumilo, *Cyclooxygenase and prostanoids-biological implications*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 2006, nr 60, s. 129–141; M. C. Cathcart, K. J. O’Byrne, J. V. Reynolds, J. O’Sullivan, G. P. Pidgeon, *COX-derived prostanoid pathways in gastrointestinal cancer development and progression: novel targets for prevention and intervention*, „Biochimica et Biophysica Acta” 2012, 1825 (1), s. 49–63.

³ C. S. Williams, R. N. DuBois, *Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms?*, „American Journal of Physiology” 1996, nr 270 (3 Pt 1), s. 393–400.

Ryc. 1. Rodzaje cyklooksygenazy



Substratem dla enzymu cyklooksygenazy są nienasycone kwasy tłuszczowe, z których kwas arachidonowy odgrywa najważniejszą rolę⁶. Nienasycone kwasy tłuszczowe przekształcane są do aktywnej fizjologicznie postaci poprzez ich uwalnianie z błon komórkowych. W procesie tym biorą udział fosfolipazy A2 C i D⁷. Aktywne kwasy tłuszczowe są w reakcji cyklooksygenacji i peroksydacji przekształcane do prostaglandyny G2, a następnie do prostaglandyny H2, która jest substratem do otrzymania szeregu prostaglandyn, prostacyklin oraz tromboksanów⁸.

⁴ S. Kargman, S. Charleson, M. Cartwright, J. Frank, D. Riendeau, J. Mancini, J. Evans, G. O'Neill, *Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts*, „Gastroenterology” 1996, nr 111 (2), s. 445–454.

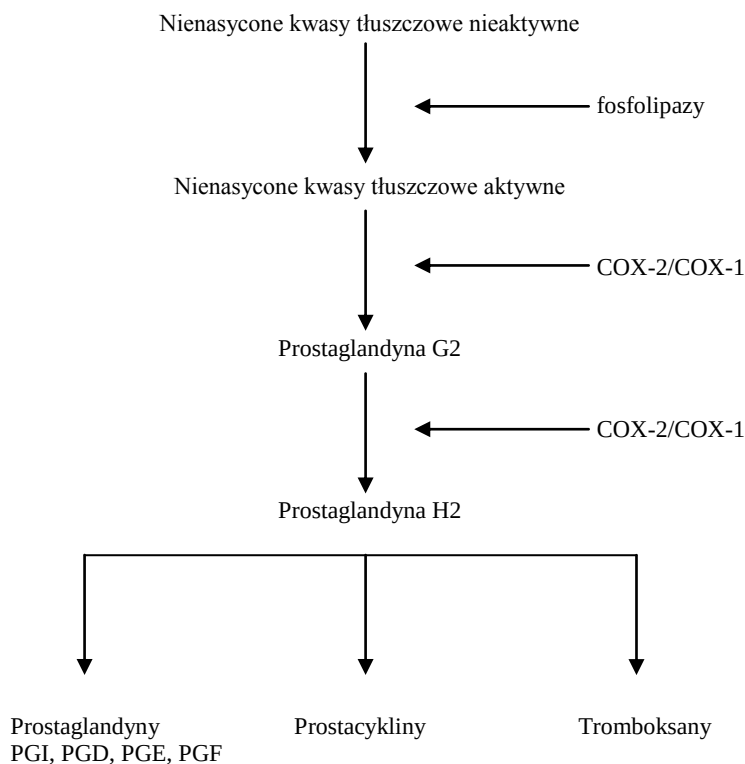
⁵ N. V. Chandrasekharan, H. Dai, K. L. Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton, D. L. Simmons, *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression*, „Proceedings of the National Academy of Science of the USA” 2002, nr 99 (21), s. 13926–13931.

⁶ J.M. Schwab, H.J. Schluesener, R. Meyermann, C.N. Serhan, *COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics?*, „Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids” 2003, nr 69 (5), s. 339–343.

⁷ B. Sadurska, M. Szumilo, *Phospholipases A in mammalian cells: structure, properties, physiological and pathological role*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 2005, nr 59, s. 116–123.

⁸ Ibidem.

Ryc. 2. Reakcje katalizowane przez COX-2 oraz COX-1



COX-1

Ekspresja genu *COX-1* jest stała i podlega niewielkiej regulacji przez czynniki wewnątrzkomórkowe czy zewnątrzkomórkowe. U człowieka gen *COX-1* znajduje się na chromosomie 9 i składa się z 11 eksonów (22 kb). *COX-1* jest zaliczany do genów podstawowego cyklu komórkowego. Natomiast białko COX-1 zbudowane jest z 599 aminokwasów i ma masę cząsteczkową 70 kDa⁹. W większości tkanek COX-1 bierze udział w utrzymaniu homeostazy organizmu¹⁰. Zwiększona ekspresja COX-1 została wykryta w stanach patologicznych, to jest w blaszkach miażdżycowych oraz w chorobie reumatoidalnej (w komórkach maziówki)¹¹.

⁹ N. V. Chandrasekharan, D. L. Simmons, *The cyclooxygenases...*, op. cit., s. 241.

¹⁰ Ibidem; S. Kargman, S. Charleson, M. Cartwright, J. Frank, D. Riendeau, J. Mancini, J. Evans, G. O'Neill, *Characterization of Prostaglandin...*, op. cit., s. 445–454.

COX-2

COX-2 bierze udział w fizjologicznych i patologicznych procesach, takich jak powstanie i utrzymywanie stanu zapalnego, gorączki, bólu, a także w powstaniu i progresji chorób nowotworowych¹². W warunkach fizjologicznych COX-2 jest wykrywane w ośrodkowym układzie nerwowym, przewodzie pokarmowym, w układzie krwionośnym nerek i śródbrzońki naczyń, łożysku, a także w sercu, chrząstce, płucach¹³. COX-2 jest enzymem indukowanym¹⁴. Gen *COX-2* znajduje się na chromosomie 1 (1q25.2-25.3), składa się z 10 egzonów. Białko COX-2 jest zbudowane z 604 aminokwasów i waży ok. 72 kDa¹⁵. Gen *COX-2* zawiera tzw. sekwencję *TATA box*, do której przyłącza się wiele czynników transkrypcyjnych. Ekspresja genu *COX-2* pobudzana jest przez czynniki wzrostu oraz czynniki zaangażowane w reakcję zapalną, np. interleukinę 1 (IL-1), czynnik martwicy nowotworu typu alfa (TNF-α), liposacharydy oraz czynniki transkrypcyjne i białka onkogenów¹⁶. Nadmierną ekspresję COX-2 wykryto w wielu nowotworach, m.in. w raku jelita grubego, żołądka, płuca, piersi, przełyku, trzustki, głowy i szyi, endometrium, stercza i pęcherza moczowego¹⁷.

¹¹ L. J. Crofford, R. L. Wilder, A. P. Ristimäki, H. Sano, E. F. Remmers, H. R. Epps, T. Hla, *Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids*, „Journal of Clinical Investigation” 1994, nr 93 (3), s. 1095–1101.

¹² C. S. Williams, M. Mann, R. N. DuBois, *The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development*, „Oncogene” 1999, nr 18 (55), s. 7908–7916.

¹³ S. Kargman, S. Charleson, M. Cartwright, J. Frank, D. Riendeau, J. Mancini, J. Evans, G. O'Neill, *Characterization of Prostaglandin...*, op. cit., s. 445–454; R. A. Soslow, A. J. Dannenberg, D. Rush, B. M. Woerner, K. N. Khan, J. Masferrer, A.T. Koki, *COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors*, „Cancer” 2000, nr 89 (12), s. 2637–2645.

¹⁴ N. V. Chandrasekharan, D. L. Simmons, *The cyclooxygenases...*, op. cit., s. 241.

¹⁵ S. B. Appleby, A. Ristimäki, K. Neilson, K. Narko, T. Hla, *Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene*, „Biochemical Journal” 1994, nr 302 (Pt 3), s. 723–727; A. Ristimäki, S. Garfinkel, J. Wessendorf, T. Maciag, T. Hla, *Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation*, „The Journal of Biological Chemistry” 1994, nr 269 (16), s. 11769–11775.

¹⁶ R. A. Soslow, A. J. Dannenberg, D. Rush, B. M. Woerner, K. N. Khan, J. Masferrer, A. T. Koki, *COX-2 is expressed...*, op. cit., s. 2637–2645; G. Chan, J. O. Boyle, E. K. Yang, F. Zhang, P. G. Sacks, J. P. Shah, D. Edelstein, R. A. Soslow, A. T. Koki, B. M. Woerner, J. L. Masferrer, A. J. Dannenberg, *Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck*, „Cancer Research” 1999, nr 59 (5), s. 991–994; B. P. van Rees, K. Saukkonen, A. Ristimäki, W. Polkowski, G. N. Tytgat, P. Drilenburg, G. J. Offerhaus, *Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach*, „Journal of Pathology” 2002, nr 196 (2), s. 171–179.

¹⁷ R. A. Soslow, A. J. Dannenberg, D. Rush, B. M. Woerner, K. N. Khan, J. Masferrer, A. T. Koki, *COX-2 is expressed...*, op. cit., s. 2637–2645; R. F. Souza, K. Shewmake, D. G. Beer, B. Cryer, S.J. Spechler, *Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells*, „Cancer Research” 2000,

COX-3

COX-3 wykryto w 2002 roku w tkance nerwowej ośrodkowego układu nerwowego oraz w ścianie aorty¹⁸. Do chwili obecnej nie znaleziono umiejscowienia genu *COX-3*. Natomiast białko COX-3 jest wynikiem alternatywnego składania produktu genu *COX-1*. Białko COX-3 zawiera 633 aminokwasy, a jego masa wynosi około 65 kDa¹⁹. Dotychczasowe badania wskazują, że w organizmie ludzkim białko COX-3 nie ma aktywności cyklooksygenazy²⁰, jakkolwiek jego rola nie została jeszcze dokładnie opisana²¹.

COX-1 a COX-2

Zgodność sekwencji aminokwasów między COX-1 a COX-2 u ludzi sięga 63%²², a co za tym idzie budowa przestrzenna obu białek jest również podobna. Reaktywność obu izoenzymów zarówno do substratów, jak i inhibitorów jest znaczna²³. Substratem COX-1 może być jedynie kwas arachidonowy i kwas dihomo-g-linoleinowy, natomiast dla COX-2 jest to również kwas α -linoleinowy i eikozapentanowy²⁴.

CYKLOOKSYGENAZA 2 A POWSTANIE I ROZWÓJ RAKA

Nadekspresja COX-2 prowadzi do powstania i rozwoju raka poprzez wpływ na apoptozę, neoangiogenezę, tworzenie przerzutów czy układ immunologiczny.

nr 60 (20), s. 5767–5772; A. Ristimäki, O. Nieminen, K. Saukkonen, K. Hotakainen, S. Nordling, C. Haglund, *Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder*, „American Journal of Pathology” 2001, nr 158 (3), s. 849–853; K. Saukkonen, O. Nieminen, B. van Rees, S. Vilkki, M. Harkonen, M. Juhola, J.P. Mecklin, P. Sipponen, A. Ristimäki, *Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma*, „Clinical Cancer Research” 2001, nr 7 (7), s. 1923–1931.

¹⁸ N. V. Chandrasekharan, H. Dai, K. L. Roos, N.K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton, D. L. Simmons, *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant...*, op. cit., s. 13926–13931.

¹⁹ D. L. Simmons, R. M. Botting, T. Hla, *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition*, „Pharmacological Reviews” 2004, nr 56 (3), s. 387–437.

²⁰ J. A. Snipes, B. Kis, G. S. Shelness, J. A. Hewett, D. W. Busija, *Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative cyclooxygenase-3) in rat*, „Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics” 2005, nr 313 (2), s. 668–676.

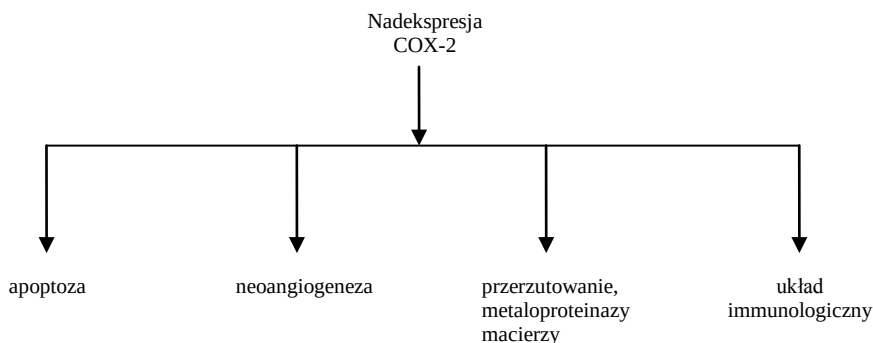
²¹ S. B. Appleby, A. Ristimäki, K. Neilson, K. Narko, T. Hla, *Structure of the human...*, op. cit., s. 723–727; D. L. Simmons, R. M. Botting, T. Hla, *Cyclooxygenase isozymes...*, op. cit., s. 387–437.

²² D. L. Simmons, R. M. Botting, T. Hla, *Cyclooxygenase isozymes...*, op. cit., s. 387–437.

²³ J. M. Schwab, H. J. Schluesener, R. Meyermann, C. N. Serhan, *COX-3 the enzyme...*, op. cit., s. 339–343.

²⁴ C. S. Williams, R. N. DuBois, *Prostaglandin endoperoxide synthase...*, op. cit., s. 393–400; S. Kargman, S. Charleson, M. Cartwright, J. Frank, D. Riendeau, J. Mancini, J. Evans, G. O'Neill, *Characterization of Prostaglandin...*, op. cit., s. 445–454.

Ryc. 3. Wpływ COX-2 na procesy życiowe



APOPTOZA

Apoptoza (programowana śmierć komórki) jest ważnym procesem w rozwoju i prawidłowym funkcjonowaniu organizmu i może być aktywowana na drodze zewnątrz- i wewnątrzpochodnej. Droga wewnątrzpochodna poprzez zmiany w błonie mitochondrium prowadzi do uwolnienia cytochromu c, który następnie tworzy wspólnie z czynnikiem aktywującym proteazę apoptotyczną i nieaktywną formą kaspazy 9 kompleks zwany apoptosomem. Kompleks ten uaktywnia kaskady kaspaz, które prowadzą do śmierci komórki. Prawidłowe działanie tej drogi zależy od równowagi pomiędzy czynnikami proapoptotycznymi a czynnikami antyapoptotycznymi. Główną rolę w regulacji apoptozy odgrywa rodzina białek BCL-2, do której należą zarówno białka proapoptotyczne – BAX, BAD, BID, BIK, jak i antyapoptotyczne – BCL-2 i BCL-XL.

Droga zewnątrzpochodna inicjuje apoptozę poprzez aktywację receptorów na powierzchni komórki. Do receptorów tych zalicza się np. receptor dla czynnika martwicy nowotworu (TNFR). Aktywacja receptora uruchamia kaskadę kaspaz, które prowadzą do śmierci komórki.

Nadekspresja COX-2 hamuje apoptozę poprzez wzrost aktywności białka antyapoptotycznego BCL-2 oraz aktywację szlaku kinazy serotoninowo-treoninowej²⁵. Nadekspresja COX-2 wpływa na stężenie i stabilizację surwiwiny, a to zwiększa oporność na apoptozę (surwiwina – białko wiążące kaspazy i uniemożliwiające ich aktywację)²⁶.

²⁵ K. M. Leahy, A. T. Koki, J. L. Masferrer, *Role of cyclooxygenases in angiogenesis*, „Current Medical Chemistry” 2000, nr 7 (11), s. 1163–1170.

²⁶ K. Krysan, H. Dalwadi, S. Sharma, M. Pold, S. Dubinett, *Cyclooxygenase 2-dependent expression of survivin is critical for apoptosis resistance in non-small cell lung cancer*, „Cancer Research” 2004, nr 64 (18), s. 6359–6362.

NEOANGIOGENEZA

Guz nie większy niż 1–2 mm średnicy może być zaopatrywany w tlen za pośrednictwem dyfuzji z otaczających go tkanek. Natomiast wzrost guzów wymaga wytworzenia własnej sieci naczyń krwionośnych i jest to krytyczny proces zarówno dla wzrostu guza pierwotnego, jak i dla tworzących się przerzutów. Przejście guza z fazy beznaczyniowej w naczyniową jest niezwykle ważne w progresji nowotworowej i nazywane jest przełomem angiogenym (ang. *angiogenic switch*)²⁷. Obecnie naukowcy bardziej skłaniają się ku teorii, że nowe naczynia nowotworowe nie tworzą się *de novo*, lecz powstają z naczyń już istniejących²⁸. Znanych jest kilka mechanizmów powstawania naczyń w guzie nowotworowym, z których najczęściej występującym jest proces tzw. pączkowania (ang. *sprouting angiogenesis*). Polega on na powstawaniu naczyń z już istniejących poprzez formowanie się kolumn komórek śródbłonkowych, których wydłużanie odbywa się w kierunku guza nowotworowego i prowadzi do powstawania zamkniętych pętli i sieci kapilarnych. Pozostałe mechanizmy powstawania naczyń to wgłobienie (rozpad naczynia większego na mniejsze naczynia) i mimikra (powstawanie struktur naczyniopodobnych)²⁹.

Proces angiogenezy nowotworowej jest procesem przewlekłym, regulowanym przez czynniki pobudzające i hamujące. W swoich etapach (degradacja błony podstawnej, migracja i proliferacja komórek śródbłonkowych, tworzenie struktur tubulopodobnych i stabilizacja nowych naczyń) jest podobny do angiogenezy fizjologicznej³⁰.

Wzrost masy guza bez jednoczesnego wytworzenia nowych naczyń krwionośnych powoduje niedotlenienie komórek (hipoksja). Tak wytworzone specyficzne środowisko indukuje czynnik transkrypcyjny HIF-1 α oraz HIF-2 α (ang. *hypoxia inducible factor-HIF*), który aktywuje transkrypcję genów ułatwiających przetrwanie komórek w warunkach hipoksji, a jednocześnie wpływa na progresję nowotworową³¹. Wśród aktywowanych genów najważniejszy jest czynnik

²⁷ V. Baeriswyl, G. Christofori, *The angiogenic switch in carcinogenesis*, „Seminars in Cancer Biology” 2009, nr 19 (5), s. 329–337.

²⁸ M. R. Richardson, M. C. Yoder, *Endothelial progenitor cells: quo vadis?*, „Journal of Molecular and Cellular Cardiology” 2011, nr 50 (2), s. 266–272.

²⁹ B. Dome, M. J. Hendrix, S. Paku, J. Tovari, J. Timar, *Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications*, „American Journal of Pathology” 2007, nr 170 (1), s. 1–15.

³⁰ A. S. Chung, J. Lee, N. Ferrara, *Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis*, „Nature Reviews Cancer”, nr 10 (7), s. 505–514; A. Raza, M. J. Franklin, A. Z. Dudek, *Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis*, „American Journal of Hematology” 2010, nr 85 (8), s. 593–598.

³¹ J. W. Lee, S. H. Bae, J. W. Jeong, S. H. Kim, K. W. Kim, *Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions*, „Experimental and Molecular Medicine” 2004, nr 36 (1), s. 1–12; J. D. Gordan, M. C. Simon, *Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype*, „Current Opinion in Genetics & Development” 2007, nr 17 (1), s. 71–77.

wzrostu śródbłonna naczyń (ang. *vascular endothelial growth factor* – VEGF) i różne jego izoformy oraz COX-2³². VEGF poprzez receptory VEGFR1 oraz VEGFR2 stymuluje angiogenezę natomiast VEGFR3 wpływa na limfoangiogenezę³³. Ekspresja VEGF oraz COX-2 występuje w wielu nowotworach³⁴. Nadekspresja COX-2 prowadzi do powstania i wzrostu nowych naczyń bezpośrednio poprzez produkty takie jak: tromboksan A₂ (TXA₂) prostaglandyna E₂ (PGE₂) i prostacyklina I₂ (PGI₂) oraz pośrednio poprzez zwiększenie ekspresji i aktywności VEGF, interleukiny 8 (IL-8) oraz chemokin ENA-78 (ang. *epithelial neutrophil-activating protein 78*)³⁵. PGE₂ wpływa na wytwarzanie VEGF przez przemieszczenie HIF-1α i HIF-2α z cytoplazmy do jądra komórki³⁶. Natomiast TXA₂ pobudza komórki endotelium do migracji i tworzenia naczyniopodobnych struktur³⁵. Wytwarzana już w komórkach śródbłonna naczyń PGI₂ rozszerza naczynia oraz działa antyagregacyjnie w stosunku do komórek krwi. Dotychczasowe wyniki badań dotyczących stosowania inhibitorów COX-2 jako czynników blokujących proces neoangiogenezy są obiecujące³⁷.

Stosowanie inhibitorów procesu angiogenezy budzi duże nadzieje w terapii chorób nowotworowych, ale niestety długotrwałe stosowanie leków antyangiogennych powoduje wzrost inwazyjności oraz powstawanie przerzutów³⁸. Terapia powinna uwzględniać mechanizmy angiogenezy nowotworowej. Poznanie molekularnych mechanizmów neoangiogenezy niezaprzeczalnie przyczyni się do skuteczniejszej terapii przeciwnowotworowej.

Dotychczas tylko cztery leki uzyskały aprobatę agencji FDA (ang. Food and Drug Administration). Bewacizumab (Awastin)-przeciwciało przeciwko VEGF oraz trzy inhibitory kinaz tyrozynowych: sorafenib, sunitinib i pazopanib³⁹.

³² V. Baeriswyl, G. Christofori, *The angiogenic switch in carcinogenesis*, op. cit., s. 329–337; J. L. Masferrer, K. M. Leahy, A. T. Koki, B. S. Zweifel, S. L. Settle, B. M. Woerner, D. A. Edwards, A. G. Flickinger, R. J. Moore, K. Seibert, *Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors*, „Cancer Research” 2000, nr 60 (5), s. 1306–1311.

³³ V. Baeriswyl, G. Christofori, *The angiogenic switch...*, op. cit., s. 329–337.

³⁴ D. P. Toomey, J. F. Murphy, K. C. Conlon, *COX-2, VEGF and tumour angiogenesis*, „Surgeon” 2009, nr 7 (3), s. 174–180.

³⁵ J. M. Schwab, H. J. Schluesener, S. Laufer, *COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol?*, „Lancet” 2003, nr 361 (9362), s. 981–982; M. D. Salvado, A. Alfranca, J. Z. Haeggstrom, J. M. Redondo, *Prostanoids in tumor angiogenesis: therapeutic intervention beyond COX-2*, „Trends in Molecular Medicine”, nr 18 (4), s. 233–243.

³⁶ M. Liu, S. C. Yang, S. Sharma, J. Luo, X. Cui, K. A. Peebles, M. Huang, M. Sato, R. D. Ramirez, J. W. Shay, J. D. Minna, S. M. Dubinett, *EGFR signaling is required for TGF-beta 1 mediated COX-2 induction in human bronchial epithelial cells*, „American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology” 2007, nr 37 (5), s. 578–588.

³⁷ M. D. Salvado, A. Alfranca, J. Z. Haeggstrom, J. M. Redondo, *Prostanoids in tumor angiogenesis...*, op. cit., s. 233–243.

³⁸ M. S. Widel, M. Widel, *Mechanisms of metastasis and molecular markers of malignant tumor progression. I. Colorectal cancer*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 2006, nr 60, s. 453–470.

³⁹ J. M. Ebos, R. S. Kerbel, *Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis*, „Nature Reviews Clinical Oncology” 2011, 8 (4), s. 210–221.

Sorafenib hamuje aktywność m.in. VEGFR2, VEGFR3. Sunitinib działa m.in. na VEGFR1 i VEGFR2. Pazopanib na VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3. Inhibitory te mogą być stosowane w przypadku raka jelita grubego, płuc i piersi, a także u chorych, u których występuje ekspresja wyżej wymienionych receptorów⁴⁰.

METALOPROTEINAZY I TWORZENIE PRZERZUTÓW

Tworzenie przerzutów nowotworowych jest procesem złożonym. Komórki rakowe uwolnione ze zmiany pierwotnej, aby dokonać inwazji otaczających tkanek, muszą przekroczyć błonę podstawną, a także otaczającą warstwę komórek śródbłonka naczyń zaopatrujących guz nowotworowy, następnie wnikać do naczyń chłonnych i (lub) krwionośnych (ang. *intravasation*) i migrować przez ściany naczyń do otaczających tkanek (ang. *extravasation*), gdzie proliferują, tworząc nowe ogniska raka⁴¹.

Błona podstawna jest siecią białek, która tworzy barierę między nabłonkiem (śródbłonkiem) naczyń a otaczającą tkanką; ogranicza ona migrację komórek prawidłowych. Komórki rakowe upośledzają funkcję błony podstawnej poprzez degradację jej składników. Jest to kluczowy element prowadzący do przerzutów. Proces degradacji składników błony podstawnej wymaga aktywacji enzymów proteolitycznych, m.in. proteinaz serynowych oraz metaloproteinaz (ang. *metalloproteinases* – MMPs). Metaloproteinazy zawierają cynk i wydzielane są jako proenzymy, które ulegają aktywacji w przestrzeni pozakomórkowej przez inne proteinazy. Metaloproteinazy dzielą się na 4 grupy w zależności od substratów, na jakie działają: kolagenazy, matrylizyny, stromelizyny i żelatynazy⁴².

Metaloproteinaza 2 (MMP-2), nazywana żelatynazą A, i metaloproteinaza 9 (MMP-9), nazywana żelatynazą B, są głównie związane z progresją raka i korelują z krótszym przeżyciem chorych⁴³. Wzrost ekspresji COX-2 powoduje wzrost aktywności metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9, które wpływają na zwiększenie zdolności do naciekania i tworzenia przerzutów. PGE₂, działając przez receptor czwarty prostaglandyny E (EP4), nasila ekspresję MMP-2.

Adhezja do substancji zewnątrzkomórkowej jest ważnym etapem rozpoczynającym tworzenie przerzutów. Proces ten zależy głównie od białka CD44⁴⁴.

⁴⁰ Ibidem.

⁴¹ M. S. Widel, M. Widel, *Mechanisms of metastasis...*, op. cit., s. 453–470.

⁴² H. Nagase, J. F. Woessner Jr, *Matrix metalloproteinases*, „The Journal of Biological Chemistry” 1999, nr 274 (31), s. 21491–21494.

⁴³ S. B. Somiari, C. D. Shriver, C. Heckman, C. Olsen, H. Hu, R. Jordan, C. Arciero, S. Russell, G. Garguilo, J. Hooke, R.I. Somiari, *Plasma concentration and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with breast disease, breast cancer and at risk of developing breast cancer*, „Cancer Letters” 2006, nr 233 (1), s. 98–107.

⁴⁴ A. Bartolazzi, R. Peach, A. Aruffo, I. Stamenkovic, *Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development*, „Journal of Experimental Medicine” 1994, nr 180 (1), s. 53–66.

CD44 jest receptorem powierzchniowym dla hialuronianu – głównego składnika macierzy zewnątrzkomórkowej. Nowotwory wykazujące nadekspresję COX-2 często mają również nadekspresję CD44, która wpływa na wzrost inwazyjności raka⁴⁵. Dodatkowo opisano związek pomiędzy poziomem ekspresji COX-2 a białkami kompleksu E-kadheryny, które są bezpośrednio związane z tworzeniem przerzutów na drodze nabywania przez komórki raka cech komórek mezenchymalnych (ang. *epithelial mesenchymal transition* – EMT)⁴⁶.

UKŁAD IMMUNOLOGICZNY

Układ immunologiczny odgrywa ważną rolę w niszczeniu zmienionych nowotworowo komórek. Odpowiada za to odpowiedź komórkowa, głównie komórki T. Najczęściej dochodzi do zmniejszenia liczby limfocytów T, zmniejszenia subpopulacji limfocytów T CD4+, zmniejszenia stosunku CD4+/CD8+, upośledzenia zdolności do proliferacji stymulowanej mitogenami oraz zmniejszenia aktywności cytotoksycznej komórek NK. Nadekspresja COX-2 poprzez nadprodukcję PGE₂ zaburza równowagę pomiędzy stężeniami interleukiny 10 (IL-10) i interleukiny 12 (IL-12)⁴⁷, które bezpośrednio wpływają na odpowiedź komórkową. Wzrost stężenia IL-10 hamuje odpowiedź komórkową, podobny skutek wywołuje zmniejszenie stężenia IL-12. Prowadzi to do immunosupresji wywołanej przez guz i nasila angiogenezę⁴⁸.

⁴⁵ S. Misra, L. M. Obeid, Y. A. Hannun, S. Minamisawa, F. G. Berger, R. R. Markwald, B. P. Toole, S. Ghatak, *Hyaluronan constitutively regulates activation of COX-2-mediated cell survival activity in intestinal epithelial and colon carcinoma cells*, „The Journal of Biological Chemistry” 2008, nr 283 (21), s. 14335–14344; S. Misra, V. C. Hascall, F. G. Berger, R. R. Markwald, S. Ghatak, *Hyaluronan, CD44, and cyclooxygenase-2 in colon cancer*, „Connective Tissue Research” 2008, nr 49 (3), s. 219–224.

⁴⁶ R. Sitarz, R. J. Leguit, W. W. de Leng, F. H. Morsink, W. P. Polkowski, R. Maciejewski, G. J. Offerhaus, A. N. Milne, *Cyclooxygenase-2 mediated regulation of E-cadherin occurs in conventional but not early-onset gastric cancer cell lines*, „Cellular Oncology” 2009, nr 31 (6), s. 475–485; M. Dohadwala, S. C. Yang, J. Luo, S. Sharma, R. K. Batra, M. Huang, Y. Lin, L. Goodglick, K. Krysan, M. C. Fishbein, L. Hong, C. Lai, R. B. Cameron, R. M. Gemmill, H. A. Drabkin, S. M. Dubinett, *Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer*, „Cancer Research” 2006, nr 66 (10), s. 5338–5345.

⁴⁷ M. Huang, M. Stolina, S. Sharma, J.T. Mao, L. Zhu, P.W. Miller, J. Wollman, H. Herschman, S.M. Dubinett, *Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation...*, op. cit., s. 1208–1216.

⁴⁸ A. Ristimäki, N. Honkanen, H. Jankala, P. Sipponen, M. Harkonen, *Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma*, „Cancer Research” 1997, nr 57 (7), s. 1276–1280.

FUNKCJA CYKLOOKSYGENAZY

Enzymy COX spełniają ważną rolę w regulacji procesów na poziomie komórek, tkanek, narządów i układów. Poniżej wymienione zostały najważniejsze przykłady oddziaływania.

UKŁAD POKARMOWY

COX-2 w błonie śluzowej przewodu pokarmowego występuje w warunkach fizjologicznych, jakkolwiek aktywność COX-2 jest niewielka, zwykle poniżej detekcji⁴⁹. Nadekspresję COX-2 spotyka się w zmianach patologicznych, to jest gruczolakach i rakach gruczolowych oraz stanach je poprzedzających⁵⁰. Nadmierną ekspresję COX-2 spotyka się w typowym raku żołądka oraz raku kikutu żołądka, podczas gdy w raku żołądka występującym w młodym wieku ekspresja jest niewielka⁵¹. Polimorfizm w genie promotorze COX-2 w pozycji 765 jest związany z większym ryzykiem wystąpienia raka żołądka⁵². Jej nadmierną ekspresję spotka się w blisko 80% przypadków raka jelita grubego oraz w raku trzustki⁵³.

UKŁAD NACZYNIOWY

W warunkach fizjologicznych ekspresja COX-1 w śródbłonku naczyń jest niewielka. Zwiększenie świadczy o uszkodzeniu ściany naczynia, sugerując miażdżycę⁵⁴. Ekspresja COX-2 jest ważna w ochronie komórek serca uszkodzonych

⁴⁹ B. P. van Rees, K. Saukkonen, A. Ristimäki, W. Polkowski, G. N. Tytgat, P. Driltenburg, G. J. Offerhaus, *Cyclooxygenase-2 expression...*, op. cit., s. 171–179; K. Saukkonen, O. Nieminen, B. van Rees, S. Vilkki, M. Harkonen, M. Juhola, J. P. Mecklin, P. Sipponen, A. Ristimäki, *Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia...*, op. cit., s. 1923–1931; A. Ristimäki, N. Honkanen, H. Jankala, P. Sipponen, M. Harkonen, *Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma*, op. cit., s. 1276–1280.

⁵⁰ S. C. Wong, M. Fukuchi, P. Melnyk, I. Rodger, A. Giaid, *Induction of cyclooxygenase-2...*, op. cit., s. 100–103.

⁵¹ A. N. Milne, R. Carvalho, F. M. Morsink, A. R. Musler, W. W. de Leng, A. Ristimäki, G. J. Offerhaus, *Early-onset gastric cancers have a different molecular expression profile than conventional gastric cancers*, „Modern Pathology” 2006, nr 19 (4), s. 564–572.

⁵² R. Sitarz, R. J. Leguit, W. W. de Leng, M. Polak, F. M. Morsink, O. Bakker, R. Maciejewski, G. J. Offerhaus, A. N. Milne, *The COX-2 promoter polymorphism -765 G>C is associated with early-onset, conventional and stump gastric cancers*, „Modern Pathology” 2008, nr 21 (6), s. 685–690.

⁵³ O. N. Tucker, A. J. Dannenberg, E. K. Yang, F. Zhang, L. Teng, J. M. Daly, R. A. Sollow, J. L. Masferrer, B. M. Woerner, A. T. Koki, T. J. Fahey 3rd, *Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer*, „Cancer Research” 1999, nr 59 (5), s. 987–990.

⁵⁴ S. C. Wong, M. Fukuchi, P. Melnyk, I. Rodger, A. Giaid, *Induction of cyclooxygenase-2...*, op. cit., s. 100–103.

przez niedokrwienie od początku zadziałania bodźca niedokrwiennego i jest czułym wskaźnikiem uszkodzenia ściany naczyń i serca⁵⁵.

UKŁAD NERWOWY

W ośrodkowym układzie nerwowym wykryto obecność wszystkich trzech izoenzymów COX. Fizjologiczną, niewielką ekspresję COX-2 wykryto w przodomózgowiu i rdzeniu kręgowym⁵⁶. Zwiększoną ekspresję COX-2 obserwuje się w stanach zapalnych, chorobach zwyrodnieniowych, nowotworowych oraz w stanach przewlekłego stresu.

UKŁAD MOCZOWO-PŁCIOWY

COX-2 wykryto w aparacie przykłębuszkowym, komórkach nabłonkowych kanalików nefronu oraz komórkach śródmiąższowych brodawki nerkowej. COX-2 zmniejsza absorpcję sodu i wpływa na uwalnianie reniny i aktywację szlaku renina-angiotensyna-aldosteron (RAA)⁵⁷.

Ekspresję COX-2 opisano w nabłonku oraz nasieniowodzie u mężczyzn, a u kobiet w komórkach wydzielniczych nabłonka jajowodów oraz w nabłonku błony śluzowej trzonu macicy. Aktywność COX-2 jest odpowiedzialna za angiogenezę i rozpoczęcie formowania łożyska, a jej ekspresja zwiększa się wraz z wiekiem ciążowym. Ekspresja COX-2 jest nieodzownym czynnikiem warunkującym prawidłową owulację, zapłodnienie i implantację⁵⁸.

Pomimo wielu ważnych funkcji fizjologicznych w układzie moczowo-płciowym ekspresja COX-2 zwiększa się w nowotworach pęcherza moczowego, gruczołu krokowego, jajnika oraz raku szyjki macicy⁵⁹. W raku szyjki macicy

⁵⁵ A. Ristimäki, O. Nieminen, K. Saukkonen, K. Hotakainen, S. Nordling, C. Haglund, *Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell...*, op. cit., s. 849–853.

⁵⁶ F. Catella-Lawson, M. P. Reilly, S. C. Kapoor, A. J. Cucchiara, S. DeMarco, B. Tournier, S. N. Vyas, G. A. Fitzgerald, *Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin*, „New England Journal of Medicine” 2001, nr 345 (25), s. 1809–1817.

⁵⁷ H. F. Cheng, R. C. Harris, *Renal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and selective cyclooxygenase-2 inhibitors*, „Current Pharmaceutical Design” 2005, nr 11 (14), s. 1795–1804.

⁵⁸ L. L. Espey, *Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction*, „Biology of Reproduction” 1994, nr 50 (2), s. 233–238; A. S. Salhab, M. N. Gharaibeh, M. S. Shomaf, B. I. Amro, *Meloxicam inhibits rabbit ovulation*, „Contraception” 2001, nr 63 (6), s. 329–333.

⁵⁹ K. Yamagata, K. I. Andreasson, W. E. Kaufmann, C. A. Barnes, P. F. Worley, *Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids*, „Neuron” 1993, nr 11 (2), s. 371–386; J. L. Young, A. A. Jazaeri, C. J. Darus, S. C. Modesitt, *Cyclooxygenase-2 in cervical neoplasia: a review*, „Gynecologic Oncology” 2008, nr 109 (1), s. 140–145.

ekspresja COX-2 związana jest ze zwiększoną gęstością naczyń i z gorszym rokowaniem⁶⁰, a stosowanie inhibitorów COX-2 zwiększa skuteczność radioterapii⁶¹.

UKŁAD ODDECHOWY

W normalnym nabłonku w płucach nie stwierdza się obecności COX-2⁶². Ekspresja COX-2 wzrasta w zapaleniach i zmianach patologicznych prowadzących do raka⁶³. Nadekspresję COX-2 wykryto w 70% przypadków gruczolakoraka⁶⁴ oraz 50% raka płaskonabłonkowego⁶⁵. Nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją COX-2 a cechami klinicznymi (wiekiem, płcią, stopniem zaawansowania)⁶⁶.

INHIBITORY COX-2

Inhibitory COX-2 ze względu na swoje działanie przeciwbólowe, przeciwzapalne oraz przeciwgorączkowe są najczęściej przyjmowanymi lekami. Głównie przyjmowane są w bólach o umiarkowanym i niewielkim nasileniu. Niestety długotrwale ich stosowanie powoduje częste efekty uboczne w postaci krwawień czy perforacji⁶⁷. Stosowanie selektywnych inhibitorów COX-2 podnosi

⁶⁰ S. Zha, V. Yegnasubramanian, W. G. Nelson, W. B. Isaacs, A. M. De Marzo, *Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective*, „Cancer Letters” 2004, nr 215 (1), s. 1–20.

⁶¹ M. G. Noordhuis, J. J. Eijnsink, F. Roossink, P. de Graeff, E. Pras, E. Schuurin, G. B. Wisman, G. H. de Bock, A. G. van der Zee, *Prognostic cell biological markers in cervical cancer patients primarily treated with (chemo)radiation: a systematic review*, „International Journal of Radiation Oncology*Biophysics” 2011, nr 79 (2), s. 325–334.

⁶² O. N. Tucker, A. J. Dannenberg, E. K. Yang, F. Zhang, L. Teng, J. M. Daly, R. A. Soslowski, J. L. Masferrer, B. M. Woerner, A. T. Koki, T. J. Fahey 3rd, *Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer*, op. cit., s. 987–990.

⁶³ C. Mascaux, B. Martin, J. M. Verdebout, V. Ninane, J. P. Sculier, *COX-2 expression during early lung squamous cell carcinoma oncogenesis*, „European Respiratory Journal” 2005, nr 26 (2), s. 198–203.

⁶⁴ T. Hida, Y. Yatabe, H. Achiwa, H. Muramatsu, K. Kozaki, S. Nakamura, M. Ogawa, T. Mitsudomi, T. Sugiura, T. Takahashi, *Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas*, „Cancer Research” 1998, nr 58 (17), s. 3761–3764.

⁶⁵ A. Yuan, C. J. Yu, C. T. Shun, K. T. Luh, S. H. Kuo, Y. C. Lee, P. C. Yang, *Total cyclooxygenase-2 mRNA levels correlate with vascular endothelial growth factor mRNA levels, tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer patients*, „International Journal of Cancer” 2005, nr 115 (4), s. 545–555.

⁶⁶ Ibidem.

⁶⁷ R. Jones, G. Rubin, F. Berenbaum, J. Scheiman, *Gastrointestinal and cardiovascular risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, „American Journal of Medicine” 2008, nr 121 (6), s. 464–474.

ryzyko zawału mięśnia sercowego i udaru mózgu, dlatego ich stosowanie powinno być ograniczane. Blokowanie aktywności COX-2 powoduje regresję guza nowotworowego, zwiększenie wokół niego nacieku limfocytarnego, a poprzez prostanoidy wpływa na dojrzewanie komórek dendrytycznych, co wzmacnia odpowiedź T-komórkową.

Chorzy z nadmierną ekspresją COX-2 mogliby odnieść korzyść z leczenia selektywnymi i nieselektywnymi inhibitorami COX-2. Inhibitory COX mają charakterystyczne dla siebie miejsca wiązania w centrum katalitycznym, np. kwas acetylosalicylowy łączy się z seryną w pozycji 530, a ibuprofen z arginina w pozycji 120⁶⁸. Badania epidemiologiczne sugerują, że stosowanie aspiryny i niesterydowych leków przeciwzapalnych zmniejsza ryzyko raka żołądka, jelita grubego oraz płuca⁶⁹. Klasycznym przykładem jest zatwierdzony przez amerykańską FDA celekoksyb (Celebrex® – selektywny inhibitor COX-2) stosowany w profilaktyce raka jelita grubego u chorych z rodzinną polipowatością jelita grubego. Hamuje on powstawanie i rozwój polipów, a więc zmniejsza ryzyko powstania raka. Niestety ze względu na działania niepożądane (najczęściej ryzyko zawału serca i udaru mózgu) w wielu państwach został on wycofany z użycia. Nadal podejmowane są intensywne badania w celu opracowania nowych leków z tej grupy pozbawionych efektów ubocznych⁷⁰. Ostatnie badania pokazują, że inhibitory COX-2 nasilają efekt radioterapii⁷¹ i poprawiają skuteczność chemioterapii⁷².

⁶⁸ C. S. Williams, M. Mann, R. N. DuBois, *The role of cyclooxygenases...*, op. cit., s. 7908–7916.

⁶⁹ W. H. Wang, J. Q. Huang, G. F. Zheng, S. K. Lam, J. Karlberg, B. C. Wong, *Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis*, „Journal of the National Cancer Institute” 2003, nr 95 (23), s. 1784–1791; M. A. Hull, *Cyclooxygenase-2: how good is it as a target for cancer chemoprevention?*, „European Journal of Cancer” 2005, nr 41 (13), s. 1854–1863.

⁷⁰ M. C. Cathcart, K. J. O’Byrne, J. V. Reynolds, J. O’Sullivan, G. P. Pidgeon, *COX-derived prostanoid pathways...*, op. cit., s. 49–63.

⁷¹ K. R. Grimes, G. W. Warren, F. Fang, Y. Xu, W. H. St. Clair, *Cyclooxygenase-2 inhibitor, nimesulide, improves radiation treatment against non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo*, „Oncology Reports” 2006, nr 16 (4), s. 771–776.

⁷² N. J. Bundred, N. L. Barnes, *Potential use of COX-2-aromatase inhibitor combinations in breast cancer*, „British Journal of Cancer” 2005, nr 93, Suppl. 1:S10-15; E. Lasalvia-Prisco, P. Goldschmidt, F. Galmarini, S. Cucchi, J. Vazquez, M. Aghazarian, E. Lasalvia-Galante, W. Golomar, W. Gordon, *Addition of an induction regimen of antiangiogenesis and antitumor immunity to standard chemotherapy improves survival in advanced malignancies*, „Medical Oncology” 2012, nr 29 (5), s. 3626–3633.

WNIOSKI

Wzrost ekspresji COX-2 już w stanach przednowotworowych czyni ją kluczowym elementem w łańcuchu zmian prowadzących do powstania nowotworu. Poziom ekspresji COX-2 może być potencjalnym biomarkerem selekcionujących chorych, dla których leczenie inhibitorami COX mogłoby skutecznie zostać wykorzystane w terapii przeciwnowotworowej.

ABSTRACT

Cyclooxygenase is an enzyme involved in many physiological and pathological processes. It catalyzes the formation of prostaglandins, prostacyclins and thromboxanes from arachidonic acid. It has been reported that cyclooxygenase-2 (COX-2) modulates the secretion of proinflammatory mediators and its expression is associated with the promotion of the process of tumorigenesis initiation, transformation, progression and cancer metastasis.

Increased expression of COX-2 in premalignant lesions makes it a key element in a chain of changes leading to cancer. So far, advances in the evaluation of COX-2 molecular mechanisms did not bring spectacular discoveries. Pathomechanisms of COX-2 activities are still not sufficiently understood and therefore, require further research.

Currently, COX-2 inhibitors are one of the most commonly used medications. Unfortunately, their long-term use causes many side effects. The first report about the use of plant substances with anti-inflammatory and analgesic activity (COX-2 inhibitors) was reported by Hippocrates in the 5th century BC.

The present review discusses the most important mechanisms by which a particular COX-2 isomer leads to the formation and development of cancer.

Aktualnie realizowane projekty związane z cyklooksygenazą 2

I

W Klinice Chirurgii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie realizowany jest projekt „Polimorfizm COX-2 w procesie wznowy i tworzenia przerzutów raka jelita grubego”. Projekt jest finansowany ze środków przyznanych w ramach programu stypendialnego „Specjalizacja i Kompetencje – Program Rozwojowy Uniwersytetu Medycznego w Lublinie”.

Istnieją doniesienia, że polimorfizm w genie promotorze w pozycji 765 odpowiada za poziom ekspresji COX-2, gdzie G nukleotyd jest związany ze wzrostem ekspresji COX-2.

Celem projektu jest analiza zależności pomiędzy polimorfizmem 765 G<C w genie promotorowym COX-2 a możliwością powstania wznowy miejscowej lub przerzutów odległych po radykalnym chirurgicznym leczeniu chorych na raka jelita grubego. Chorzy rekrutowani do grupy badanej są operowani w tej samej Klinice. Pacjenci zostali podzieleni na 2 grupy zależnie od czasu wystąpienia wznowy lub przerzutów odległych po leczeniu raka jelita grubego – do okresu 4 lat i ponad 5 lat po zabiegu operacyjnym. Materiałem do analizy jest genomowe DNA, gdzie określany jest polimorfizm w genie promotorze COX-2 w pozycji 765, a następnie oceniany jest jego związek z powstaniem wznowy lub przerzutu odległego u chorych po radykalnym chirurgicznym leczeniu raka jelita grubego.

II

W Katedrze i Zakładzie Anatomii Prawidłowej realizowany jest projekt „COX-2 zależna regulacja E-kadheryny w rakach żołądka”. Projekt uzyskał wsparcie Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego 4238/B/P01/2010/38.

W projekcie badamy zależności między COX-2 a E-kadheryną na poziomie genu i białka (poziom ekspresji, lokalizacja). Badamy rolę EMT czynników, a wśród nich SNAIL, ZEB1, TWIST w regulacji tych zależności. Przewidujemy, iż wzajemne relacje między COX-2 a E-kadheryną różnią się między rakiem żołądka występującym u młodych ludzi (ang. *early onset gastric cancer*) a nowotworem u osób w starszym wieku (ang. *conventional gastric cancer*) oraz w guzach pierwotnych raka żołądka i guzach przerzutowych raka żołądka. W grupie pacjentów młodych (<45 roku życia) bez historii raka żołądka w rodzinie uważa się, że najważniejszą rolę w powstaniu nowotworu odgrywa predyspozycja genetyczna, dlatego też patomechanizm zmian nowotworowych wydaje się odmienny niż w raku żołądka u osób starszych (>45 roku życia). Projekt jest unikatowy ze względu na materiał badawczy. Materiał zostanie podzielony na dwie grupy: pacjenci z rakiem żołądka w młodym wieku (<45 lat) oraz pacjenci z rakiem żołądka w starszym wieku (>45 lat). Zaletą projektu jest to, że badania będziemy prowadzili jednocześnie na nowotworowych liniach komórkowych oraz materiale tkankowym. Jest to projekt wieloaspektowy, w którym stosujemy nowoczesne techniki biologii molekularnej.

BIBLIOGRAFIA

1. Chandrasekharan N. V., Simmons D. L., *The cyclooxygenases*, „Genome Biology” 2004, nr 5 (9), s. 241.
2. Burdan F., Chalas A., Szumilo J., *Cyclooxygenase and prostanoids-biological implications*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” (Online) 2006, nr 60, s. 129–141.

3. Cathcart M. C., O'Byrne K. J., Reynolds J. V., O'Sullivan J., Pidgeon G. P., *COX-derived prostanoid pathways in gastrointestinal cancer development and progression: novel targets for prevention and intervention*, "Biochimica et Biophysica Acta" 2012, nr 1825 (1), s. 49–63.
4. Williams C. S., DuBois R. N., *Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms?*, „American Journal of Physiology” 1996, nr 270 (3 Pt 1), s. 393–400.
5. Kargman S., Charleson S., Cartwright M., Frank J., Riendeau D., Mancini J., Evans J., O'Neill G., *Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts*, „Gastroenterology” 1996, nr 111 (2), s. 445–454.
6. Chandrasekharan N. V., Dai H., Roos K. L., Evanson N. K., Tomsik J., Elton T. S., Simmons D. L., *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression*, „Proceedings of the National Academy of Science of the USA” 2002, nr 99 (21), s. 13926–13931.
7. Schwab J. M., Schluesener H. J., Meyermann R., Serhan C. N., *COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics?*, „Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids” 2003, nr 69 (5), s. 339–343.
8. Sadurska B., Szumilo M., *Phospholipases A in mammalian cells: structure, properties, physiological and pathological role*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 2005, nr 59, s. 116–123.
9. Crofford L. J., Wilder R. L., Ristimaki A. P., Sano H., Remmers E. F., Epps H. R., Hla T., *Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids*, „Journal of Clinical Investigation” 1994, nr 93 (3), s. 1095–1101.
10. Williams C. S., Mann M., DuBois R. N., *The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development*, „Oncogene” 1999, nr 18 (55), s. 7908–7916.
11. Soslow R. A., Dannenberg A. J., Rush D., Woerner B. M., Khan K. N., Masferrer J., Koki A. T., *COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors*, „Cancer” 2000, nr 89 (12), s. 2637–2645.
12. Appleby S. B., Ristimaki A., Neilson K., Narko K., Hla T., *Structure of the human cyclooxygenase-2 gene*, „Biochemical Journal” 1994, nr 302 (Pt 3), s. 723–727.
13. Ristimaki A., Garfinkel S., Wessendorf J., Maciag T., Hla T., *Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation*, „The Journal of Biological Chemistry” 1994, nr 269 (16), s. 11769–11775.
14. Chan G., Boyle J. O., Yang E. K., Zhang F., Sacks P. G., Shah J. P., Edelstein D., Soslow R. A., Koki A. T., Woerner B. M., Masferrer J. L., Dannenberg A. J., *Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck*, „Cancer Research” 1999, nr 59 (5), nr 991–994.
15. van Rees B. P., Saukkonen K., Ristimaki A., Polkowski W., Tytgat G. N., Drilenburg P., Offerhaus G. J., *Cyclooxygenase-2 expression during carcinogenesis in the human stomach*, „Journal of Pathology” 2002, nr 196 (2), s. 171–179.
16. Souza R. F., Shewmake K., Beer D. G., Cryer B., Spechler S. J., *Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells*, „Cancer Research” 2000, nr 60 (20), s. 5767–5772.
17. Ristimaki A., Nieminen O., Saukkonen K., Hotakainen K., Nordling S., Haglund C., *Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder*, „American Journal of Pathology” 2001, nr 158 (3), s. 849–853.
18. Saukkonen K., Nieminen O., van Rees B., Vilkkii S., Harkonen M., Juhola M., Mecklin J. P., Sipponen P., Ristimaki A., *Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma*, „Clinical Cancer Research” 2001, nr 7 (7), s. 1923–1931.

19. Simmons D. L., Botting R. M., Hla T., *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition*, „Pharmacological Reviews” 2004, nr 56 (3), s. 387–437.
20. Snipes J. A., Kis B., Shelness G. S., Hewett J. A., Busija D. W., *Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative cyclooxygenase-3) in rat*, „Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics” 2005, nr 313 (2), s. 668–676.
21. Leahy K. M., Koki A. T., Masferrer J. L., *Role of cyclooxygenases in angiogenesis*, „Current Medical Chemistry” 2000, nr 7 (11), s. 1163–1170.
22. Krysan K., Dalwadi H., Sharma S., Pold M., Dubinett S., *Cyclooxygenase 2-dependent expression of survivin is critical for apoptosis resistance in non-small cell lung cancer*, „Cancer Research” 2004, nr 64 (18), s. 6359–6362.
23. Baeriswyl V., Christofori G., *The angiogenic switch in carcinogenesis*, „Seminars in Cancer Biology” 2009, nr 19 (5), s. 329–337.
24. Richardson M. R., Yoder M. C., *Endothelial progenitor cells: quo vadis?*, „Journal of Molecular and Cellular Cardiology” 2011, nr 50 (2), s. 266–272.
25. Dome B., Hendrix M. J., Paku S., Tovari J., Timar J., *Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications*, „American Journal of Pathology” 2007, nr 170 (1), s. 1–15.
26. Chung A. S., Lee J., Ferrara N., *Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis*, „Nature Reviews Cancer” 2010, nr 10 (7), s. 505–514.
27. Raza A., Franklin M. J., Dudek A. Z., *Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis*, „American Journal of Hematology” 2010, nr 85 (8), s. 593–598.
28. Lee J. W., Bae S. H., Jeong J. W., Kim S. H., Kim K. W., *Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions*, „Experimenatl and Mollecular Medicine” 2004, nr 36 (1), s. 1–12.
29. Gordan J. D., Simon M. C., *Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype*, „Current Opinion in Genetics & Development” 2007, nr 17 (1), s. 71–77.
30. Masferrer J. L., Leahy K. M., Koki A. T., Zweifel B. S., Settle S. L., Woerner B. M., Edwards D. A., Flickinger A. G., Moore R. J., Seibert K., *Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors*, „Cancer Research” 2000, nr 60 (5), s. 1306–1311.
31. Toomey D. P., Murphy J. F., Conlon K. C., *COX-2, VEGF and tumour angiogenesis*, „Surgeon” 2009, nr 7 (3), s. 174–180.
32. Schwab J. M., Schluesener H. J., Laufer S., *COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol?*, „Lancet” 2003, nr 361 (9362), s. 981–982.
33. Salvado M. D., Alfranca A., Haeggstrom J. Z., Redondo J. M., *Prostanoids in tumor angiogenesis: therapeutic intervention beyond COX-2*, „Trends in Molecular Medicine”, nr 18 (4), s. 233–243.
34. Liu M., Yang S. C., Sharma S., Luo J., Cui X., Peebles K. A., Huang M., Sato M., Ramirez R. D., Shay J. W., Minna J. D., Dubinett S. M., *EGFR signaling is required for TGF-beta 1 mediated COX-2 induction in human bronchial epithelial cells*, „American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology” 2007, nr 37 (5), s. 578–588.
35. Tsujii M., Kawano S., Tsuji S., Sawaoka H., Hori M., DuBois R. N., *Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells*, *Cell* 1998, nr 93(5), s. 705–716.
36. Paez-Ribes M., Allen E., Hudock J., Takeda T., Okuyama H., Vinals F., Inoue M., Bergers G., Hanahan D., Casanovas O., *Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis*, *Cancer Cell* 2009, nr 15 (3), s. 220–231.

37. Ebos J. M., Kerbel R. S., *Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis*, „Nature Reviews Clinical Oncology” 2011, 8 (4), s. 210–221.
38. Widel M. S., Widel M., *Mechanisms of metastasis and molecular markers of malignant tumor progression. I. Colorectal cancer*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 2006, nr 60, s. 453–470.
39. Nagase H., Woessner J. F. Jr, *Matrix metalloproteinases*, „The Journal of Biological Chemistry” 1999, nr 274 (31), s. 21491–21494.
40. Somiari S. B., Shriver C. D., Heckman C., Olsen C., Hu H., Jordan R., Arciero C., Russell S., Garguilo G., Hooke J., Somiari R. I., *Plasma concentration and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with breast disease, breast cancer and at risk of developing breast cancer*, „Cancer Letters” 2006, nr 233 (1), s. 98–107.
41. Bartolazzi A., Peach R., Aruffo A., Stamenkovic I., *Interaction between CD44 and hyaluronate is directly implicated in the regulation of tumor development*, „Journal of Experimental Medicine” 1994, nr 180 (1), s. 53–66.
42. Misra S., Obeid L. M., Hannun Y. A., Minamisawa S., Berger F. G., Markwald R. R., Toole B. P., Ghatak S., *Hyaluronan constitutively regulates activation of COX-2-mediated cell survival activity in intestinal epithelial and colon carcinoma cells*, „The Journal of Biological Chemistry” 2008; nr 283 (21), s. 14335–14344.
43. Misra S., Hascall V. C., Berger F. G., Markwald R. R., Ghatak S., *Hyaluronan, CD44, and cyclooxygenase-2 in colon cancer*, „Connective Tissue Research” 2008, nr 49 (3), s. 219–224.
44. Sitarz R., Leguit R. J., de Leng W. W., Morsink F. H., Polkowski W. P., Maciejewski R., Offerhaus G. J., Milne A. N., *Cyclooxygenase-2 mediated regulation of E-cadherin occurs in conventional but not early-onset gastric cancer cell lines*, „Cellular Oncology” 2009, nr 31 (6), s. 475–485.
45. Dohadwala M., Yang S. C., Luo J., Sharma S., Batra R. K., Huang M., Lin Y., Goodglick L., Krysan K., Fishbein M. C., Hong L., Lai C., Cameron R. B., Gemmill R. M., Drabkin H. A., Dubinett S. M., *Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer*, „Cancer Research” 2006, nr 66 (10), s. 5338–5345.
46. Huang M., Stolina M., Sharma S., Mao J. T., Zhu L., Miller P. W., Wollman J., Herschman H., Dubinett S. M., *Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production*, „Cancer Research” 1998, nr 58 (6), s. 1208–1216.
47. Colombo M. P., Vagliani M., Spreafico F., Parenza M., Chiodoni C., Melani C., Stoppacciaro A., *Amount of interleukin 12 available at the tumor site is critical for tumor regression*, „Cancer Research” 1996, s. 56 (11), s. 2531–2534.
48. Ristimäki A., Honkanen N., Jankala H., Sipponen P., Harkonen M., *Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma*, „Cancer Research” 1997, nr 57 (7), s. 1276–1280.
49. Wong S. C., Fukuchi M., Melnyk P., Rodger I., Giaid A., *Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappaB in myocardium of patients with congestive heart failure*, *Circulation* 1998, nr 98 (2), s. 100–103.
50. Milne A. N., Carvalho R., Morsink F. M., Musler A. R., de Leng W. W., Ristimäki A., Offerhaus G. J., *Early-onset gastric cancers have a different molecular expression profile than conventional gastric cancers*, „Modern Pathology” 2006, nr 19 (4), s. 564–572.

51. Sitarz R., Leguit R. J., de Leng W. W., Polak M., Morsink F. M., Bakker O., Maciejewski R., Offerhaus G. J., Milne A. N., *The COX-2 promoter polymorphism -765 G>C is associated with early-onset, conventional and stump gastric cancers*, „Modern Pathology” 2008, nr 21 (6), s. 685–690.
52. Tucker O. N., Dannenberg A. J., Yang E. K., Zhang F., Teng L., Daly J. M., Soslow R. A., Masferrer J. L., Woerner B. M., Koki A. T., Fahey T. J. 3rd, *Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer*, „Cancer Research” 1999, nr 59 (5), s. 987–990.
53. Catella-Lawson F., Reilly M. P., Kapoor S. C., Cucchiara A. J., DeMarco S., Tournier B., Vyas S. N., Fitzgerald G. A., *Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin*, „New England Journal of Medicine” 2001, nr 345 (25), s. 1809–1817.
54. Cheng H. F., Harris R. C., *Renal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and selective cyclooxygenase-2 inhibitors*, „Current Pharmaceutical Design” 2005, nr 11 (14), s. 1795–1804.
55. Espey L. L., *Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction*, „Biology of Reproduction” 1994, nr 50 (2), s. 233–238.
56. Salhab A. S., Gharaibeh M. N., Shomaf M. S., Amro B. I., *Meloxicam inhibits rabbit ovulation*, „Contraception” 2001, nr 63 (6), s. 329–333.
57. Yamagata K., Andreasson K. I., Kaufmann W. E., Barnes C. A., Worley P. F., *Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids*, „Neuron” 1993, nr 11 (2), s. 371–386.
58. Young J. L., Jazaeri A. A., Darus C. J., Modesitt S. C., *Cyclooxygenase-2 in cervical neoplasia: a review*, „Gynecologic Oncology” 2008, nr 109 (1), s. 140–145.
59. Zha S., Yegnasubramanian V., Nelson W. G., Isaacs W. B., De Marzo A. M., *Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective*, „Cancer Letters” 2004, nr 215 (1), s. 1–20.
60. Noordhuis M. G., Eijssink J. J., Roossink F., de Graeff P., Pras E., Schuurings E., Wisman G. B., de Bock G. H., van der Zee A. G., *Prognostic cell biological markers in cervical cancer patients primarily treated with (chemo)radiation: a systematic review*, „International Journal of Radiation Oncology*Biophysics” 2011, nr 79 (2), s. 325–334.
61. Mascaux C., Martin B., Verdebout J. M., Ninane V., Sculier J. P., *COX-2 expression during early lung squamous cell carcinoma oncogenesis*, „European Respiratory Journal” 2005, nr 26 (2), s. 198–203.
62. Hida T., Yatabe Y., Achiwa H., Muramatsu H., Kozaki K., Nakamura S., Ogawa M., Mitsudomi T., Sugiura T., Takahashi T., *Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas*, „Cancer Research” 1998, nr 58 (17), s. 3761–3764.
63. Yuan A., Yu C. J., Shun C. T., Luh K. T., Kuo S. H., Lee Y. C., Yang P. C., *Total cyclooxygenase-2 mRNA levels correlate with vascular endothelial growth factor mRNA levels, tumor angiogenesis and prognosis in non-small cell lung cancer patients*, „International Journal of Cancer” 2005, nr 115 (4), s. 545–555.
64. Jones R., Rubin G., Berenbaum F., Scheiman J., *Gastrointestinal and cardiovascular risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, „American Journal of Medicine” 2008, nr 121 (6), s. 464–474.
65. Wang W. H., Huang J. Q., Zheng G. F., Lam S. K., Karlberg J., Wong B. C., *Non-steroidal anti-inflammatory drug use and the risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis*, „Journal of the National Cancer Institute” 2003, nr 95 (23), s. 1784–1791.
66. Hull M. A., *Cyclooxygenase-2: how good is it as a target for cancer chemoprevention?*, „European Journal of Cancer” 2005, nr 41 (13), s. 1854–1863.

67. Grimes K. R., Warren G. W., Fang F., Xu Y., St. Clair W. H., *Cyclooxygenase-2 inhibitor, nimesulide, improves radiation treatment against non-small cell lung cancer both in vitro and in vivo*, „Oncology Reports” 2006, nr 16 (4), s. 771–776.
68. Bundred N. J., Barnes N. L., *Potential use of COX-2-aromatase inhibitor combinations in breast cancer*, „British Journal of Cancer” 2005, nr 93, Suppl. 1: s. 10–15.
69. Lasalvia-Prisco E., Goldschmidt P., Galmarini F., Cucchi S., Vazquez J., Aghazarian M., Lasalvia-Galante E., Golomar W., Gordon W., *Addition of an induction regimen of antiangiogenesis and antitumor immunity to standard chemotherapy improves survival in advanced malignancies*, „Medical Oncology” 2012, nr 29 (5), s. 3626–3633.

MARTA B. KACZOR

(UNIwersytet Jagielloński)

ZMIANY ZACHODZĄCE W ORGANIZMIE PŁAZÓW POD WPLYWEM JONÓW OŁOWIU

1. TOKSYCZNOŚĆ ZWIĄZKÓW OŁOWIU A ORGANIZMY ŻYWE

Ołów należy do grupy metali ciężkich niemających znaczenia w prawidłowym przebiegu procesów metabolicznych w komórce. Jest uważany przez badaczy (biologów, chemików i lekarzy klinicystów) za jedną z najbardziej niebezpiecznych trucizn¹. Do organizmów zarówno zwierzęcych, jak i ludzkich ołów może się przedostawać przez powłoki skórne oraz układ pokarmowy i oddechowy, z których niemalże w całości trafia do krwi, łącząc się z białkami osocza, i transportowany jest do wszystkich tkanek. Odkłada się w kościach i tkankach miękkich. Do narządów, które szczególnie narażone są na działanie ołowiu, należy zaliczyć wątrobę, nerki, szpik kostny oraz mózg². Bardzo niewielki procent z zaabsorbowanego ołowiu ulega wydaleniu³.

Ołów w organizmie tworzy toksyczne złogi, wywołując liczne dolegliwości i choroby. Przewlekłe oddziaływanie na organizm niskich dawek ołowiu prowadzi do wystąpienia wielu neurologicznych, hepatologicznych, rozrodczych i żołądkowo-jelitowych patologii⁴. W kościach ołów ulega akumulacji w postaci

¹ A. Kowalak, *Metale śmierci*, Krosno 1991; S. J. Stohs, D. Bagchi, *Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions*, „Free Radical Biology & Medicine” 1995, nr 18.

² L. Patric, *Lead toxicity, a review of the literature. Part I: exposure, evaluation and treatment*, „Alternative Medicine Review” 2006, nr 11.

³ I. Barabowska-Bosiacka, D. Chlubek, *Biochemiczne mechanizmy neurotoksycznego działania ołowiu*, „Postępy Biochemii” 2006, nr 52; L. Patric, *Lead toxicity...*, op. cit.

⁴ L. Patric, *Lead Toxicity Part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in pathology and treatment of lead toxicity*, „Alternative Medicine Review” 2006, nr 11; D. Quig, *Cysteine Metabolism and Metal Toxicity*, „Alternative Medicine Review” 1998, nr 3.

związków koloidalnych i krystalicznych, natomiast nagromadzony w tkankach miękkich, stanowi tzw. pulę szybko wymienną⁵. Początkowo nie powoduje on zatrucia, ale przejście między stanem nietoksyczności a zmianami patologicznymi jest stopniowe, dlatego tak trudno ustalić jednoznaczną granicę różnicującą stężenia jeszcze nieszkodliwe i już toksyczne. Trudno mówić o braku szkodliwości nawet relatywnie małej dawki ołowiu zaabsorbowanej przez organizm, ponieważ już minimalne jego ilości powodują zaburzenia metabolizmu komórkowego znacznie wcześniej, niż pojawiają się objawy ogólnoustrojowe⁶.

Ze względu na obecność ołowiu w środowisku pojawia się problem dotyczący szkodliwego wpływu jego małych dawek na organizm podczas chronicznej ekspozycji. Przyjmuje się, że istnieje ścisły związek pomiędzy jego zawartością w środowisku a czasem kontaktu tego metalu z organizmem, dlatego też można zaobserwować stopniowy wzrost stężenia Pb z wiekiem w niektórych tkankach⁷. W organizmie każde miejsce zdeponowania ołowiu posiada własny charakterystyczny czas połowicznego okresu jego eliminacji. Dlatego pomimo krótkiego okresu półtrwania we krwi stężenie ołowiu w innych tkankach może przez dłuższy czas utrzymywać się na wysokim poziomie, nawet w przypadku czasowego ustania ekspozycji⁸.

Mechanizmy toksycznego działania jonów metali ciężkich są złożone. Metale ciężkie wykazują wysokie powinowactwo do grup tiolowych, histydylowych, aminowych i karboksylowych białek, a możliwość bezpośredniego wiązania się z nimi prowadzi do zmiany ich struktury i właściwości katalitycznych⁹. Ołów wiąże się z grupami tiolowymi enzymów kluczowych dla syntezy hemu, co w rezultacie hamuje jego syntezę¹⁰. Oddziaływanie ołowiu prowadzi także do zmiany stężenia niskocząsteczkowych tioli oraz zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych – dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy i peroksydazy glutationu. Te zmiany towarzyszą wzrostowi poziomu reaktywnych form tlenu, które mogą prowadzić do stanów zapalnych śródbłónka naczyń, uszkodzają kwasy nukleinowe i hamują naprawę DNA oraz inicjują peroksydację lipidów błon komórkowych¹¹. Proces ten modyfikuje strukturę błon i zakłóca w znacz-

⁵ H. Martynowicz, R. Andrzejak, M. Mędraś, *Wpływ ołowiu na funkcje gonad męskich*, „Medycyna Pracy” 2005, nr 56.

⁶ I. Barabowska-Bosiacka, D. Chlubek, op. cit.

⁷ L. Patric, *Lead toxicity, a review...*, op. cit.; A. Skoczyńska, R. Poręba, A. Sieradzki, R. Andrzejak, U. Sieradzka, *Wpływ ołowiu i kadmu na funkcje układu immunologicznego*, „Medycyna Pracy” 2002, nr 53.

⁸ I. Barabowska-Bosiacka, D. Chlubek, op. cit.

⁹ S. S. Sharma, K. J. Dietz, *The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance*, „Trends in Plant Science” 2009, nr 14.

¹⁰ L. Patric, *Lead Toxicity Part II...*, op. cit.

¹¹ D. Fragou, A. Fragou, S. Kouidou, S. Njau, L. Kovatsi, *Epigenetic mechanism in metal toxicity*, „Toxicology Mechanism and Methods” 2011, nr 21; L. Patric, *Lead Toxicity Part II...*, op. cit.

nym stopniu funkcje mitochondriów¹². Inną przyczyną wysokiej toksyczności ołowiu jest jego współzawodnictwo z dwuwartościowymi kationami metali (np. jonem miedzi lub cynku) o miejsca wiążące w białkach (SOD, syntaza porfobilinogenowa), co prowadzi do zahamowania bądź modyfikacji ich funkcji¹³.

Biorąc pod uwagę wpływ temperatury na negatywne działanie jonów metali ciężkich, możemy wyróżnić dwa podstawowe typy toksyczności. Pierwszym z nich jest niezależna od temperatury odpowiedź na wzrost toksyczności (odpowiedź organizmu pozostaje jednakowa zarówno w niskiej, jak i wysokiej temperaturze) oraz odpowiedź zależna od zmiany temperatury, gdzie obserwujemy wzrost toksycznego działania metali wraz ze wzrostem temperatury otoczenia. Wciąż jednak istnieje pytanie, czy efekt, jaki wywiera temperatura, jest powiązany z metabolizmem toksyn, czy też z innymi procesami fizjologicznymi¹⁴.

Narażenie płazów na obecność chemicznych czynników teratogennych prowadzi do widocznej deformacji ciała żab¹⁵, wad rozwojowych zarodków i larw¹⁶, zmian układu lokomotorycznego w procesie metamorfozy¹⁷, jak również zmian behawioralnych¹⁸. Niekorzystne warunki środowiskowe powodują obniżenie przeżywalności młodych żab po metamorfozie, zmniejszenie rozmiaru ciała, pogorszenie kondycji oraz szybkości pływania. Powoduje to, że stają się one łatwą ofiarą dla atakujących je drapieżników¹⁹. Birdsall i współpracownicy (1986)²⁰ oraz Rowe z zespołem (2001)²¹ sugerują, że kontakt z niewielkimi stężeniami jonów metali ciężkich we wczesnych fazach rozwojowych przyczynia się do wyginięcia populacji.

¹² M. Valko, H. Morris, M. T. Cronin, *Metals, toxicity and oxidative stress*, „Current Medicinal Chemistry” 2005, nr 12.

¹³ S. S. Sharma, K.J. Dietz, op. cit.

¹⁴ M. C. Newman, M.A. Unger, *Fundamentals of Ecotoxicology*, Boca Raton 2003.

¹⁵ N. S. Lombourdis, D. Wray, *Heavy-metal concentration in the frog *Rana ridibunda* from a small river of Macedonia, Northern Greece*, „Environmental International” 1998, nr 24.

¹⁶ J. M. Sobotka, R. G. Radwan, *Teratogenesis induced by short – and long-term exposure of *Xenopus laevis* progeny to lead*, „Journal of Toxicology and Environmental Health” 1995, nr 44.

¹⁷ G. M. Williams, M. J. Iatropoulos, *Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity*, „Toxicologic Pathology” 2002, nr 30.

¹⁸ C. W. Steele, S. Stickler-Shaw, D. H. Taylor, *Failure of *Bufo americanus* tadpoles to avoid lead-enriched water*, „Journal of Herpetology” 1991, nr 25.

¹⁹ J. E. Houlahan, C. S. Findlay, B. R. Schmidt, A. H. Meyer, S. L. Kuzmin, *Quantitative evidence for global amphibian population declines*, „Nature” 2000, nr 404; R. Mann, J. Bidwell, *Toxicological issues for amphibians in Australia*, [w:] *Declines and Disappearances of Australian Frogs*, ed. A. Campbell, Canberra 1999, s. 185–201.

²⁰ C. W. Birdsall, C. E. Grue, A. Anderson, *Lead contamination in bullfrog *Rana catesbeiana* and green frog *R. clamitans* tadpoles inhabiting highway drainages*, „Environmental Pollution” 1986, nr 40A.

²¹ C. L. Rowe, W. A. Hopkins, V.R. Coffman, *Failed recruitment of Southern toads (*Bufo terrestris*) in trace element-contaminated breeding habitat: direct and indirect effect that may lead to a local population sink*, „Archives of Environmental Contamination and Toxicology” 2003, nr 40.

2. BIOMARKERY TOKSYCZNOŚCI OŁOWIU

Z ekologicznego punktu widzenia wpływ, jaki wywiera zanieczyszczone ołowiem środowisko naturalne na płazy, jest złożony, a oznaczenie stężenia tego metalu w organizmach gatunków wolno żyjących może odzwierciedlać ekotoksikologiczną historię środowiska ich bytowania. Płazy, jako zwierzęta niemiędrzące, są dobrym modelem badawczym, a badania analityczne mogą odzwierciedlać typowy charakter badanej populacji. Poziom wybranych parametrów w organizmach płazów może być biomarkerem lokalnego nasilenia skażenia środowiska.

2.1. UKŁAD KRWIONOŚNY

2.1.1. Liczba krwinek

Wyniki pomiarów liczby krwinek, wykonanych niezależnie przez różnych autorów dla ropuchy z gatunku *Bufo arenarum*²², są porównywalne z wynikami otrzymanymi dla innych płazów²³. U zwierząt narażonych na działanie ołowiu całkowita liczba czerwonych krwinek (RBC), białych krwinek (WBC) oraz stopień zróżnicowania leukocytów były zmienione. W ciągu jednego tygodnia, po podaniu pojedynczej dawki równej 100 mg Pb/kg, zaobserwowano znaczne obniżenie liczby czerwonych krwinek i wzrost liczby krwinek białych. Dodatkowo liczba niedojrzałych krwinek białych również znacząco wzrosła²⁴. Chiesa i współpracownicy (2006)²⁵ wykazali w eksperymencie prowadzonym przez ok. 7 tygodni na ropuchach otrzymujących raz w tygodniu zastrzyk z 50mg Pb/kg, że po upływie tego czasu ilość RBC spadła o 34%, podczas gdy liczba WBC wzrosła o 100%. Natomiast wcześniejsze badania, prowadzone przez Perí

²² M. E. Varela, M. E. Sellarés, *Sobre la morfología hemática de Bufo arenarum (Hensel)*, „Review of Society Argent Biology” 1937, nr 13.

²³ R. D. Davic, W. W. Gallati, *Erythrocyte number in three species of northern Appalachian Desmognathus (Amphibia, Urodela, Plethodontidae)*, „Journal of Herpetology” 1979, nr 13; I. Hadji-Azimi, V. Coosemans, C. Canicatti, *Atlas of adult Xenopus laevis laevis hematology*, „Developmental & Comparative Immunology” 1987, nr 11; E. Szubarkowska, Gromysz-Kalkowska K., Wójcik K., *Behavior of the fordem blond elements in Rana esculenta after repeated contacts of the animals with a therapeutic dose of foschlor*, „Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology” 1990, nr 45.

²⁴ C. E. Rosenberg, N. E. Fink, M. A. Arrieta, A. Salibián, *Effect of lead acetate on the in vitro engulfment and killing capability of the toad (Bufo arenarum) neutrophils*, „Comparative Biochemistry and Physiology” 2003, nr 136C.

²⁵ M. E. Chiesa, C. E. Rosenberg, N. E. Fink, A. Salibián, *Serum protein profile and blood cell counts in adult toads Bufo arenarum (Amphibia: Anura: Bufonidae): Effects of sublethal lead acetate*, „Archives of Environmental Contamination and Toxicology” 2006, nr 50.

i współpracowników w 1998 roku²⁶, polegające na trzytygodniowym obserwowaniu wpływu na organizm płazów pojedynczej dawki ołowiu, równej 1/10 dawki LD50, wykazały, że liczba krążących retikulocytów wzrasta znacząco i wybiórczo, bez istotnych zmian liczbowych pozostałych komórek. W związku z powyższym parametr ten mógłby być miarodajnym biomarkerem hematologicznym, odzwierciedlającym narażenie na działanie ołowiu organizmów *B. arenarum*. Warto też podkreślić, że u dorosłych osobników z tego gatunku najliczniejszą procentowo frakcją leukocytów są limfocyty, a więc podobnie jak w przypadku krwi człowieka. Wzrost liczby WBC pod wpływem działania ołowiu²⁷ może być związany z wywoływaną przez toksyny proliferacją pluripotentnych komórek macierzystych, a to z kolei może być przyczyną obniżenia zróżnicowania krążących komórek. Zjawisko to zależne jest od dawki ołowiu podanej zwierzętom²⁸.

2.1.2. Hematokryt

Hematokryt płazów może stanowić kolejny wartościowy wskaźnik przewlekłego narażenia zwierząt na działanie ołowiu. Arrieta i współpracownicy²⁹ zaobserwowali obniżenie wartości hematokrytu o 57%, po podawaniu ropuchom powtarzalnych dawek ołowiu przez okres 5–6 tygodni. Co ciekawe, nie zaobserwowano zmiany tego parametru po pojedynczym wstrzyknięciu, nawet względnie dużej dawki tego metalu³⁰. Dwie hipotezy mogą wyjaśnić skrócenie czasu półtrwania erytrocytów: 1) zmiany biosyntezy hemu³¹, 2) bezpośredni wpływ ołowiu na skład błon erytrocytów i ich właściwości fizyczne³². Ołów jest najsilniejszym czynnikiem hemolitycznym, może więc powodować niszczenie czerwonych krwinek i prowadzić do hemolizy poprzez generowanie stresu oksydacyjnego – może bezpośrednio wiązać się z fosfatydylocholiną występującą w błonach RBC, prowadząc do obniżenia poziomu fosfolipidów.

²⁶ S. I. Perí, N. E. Fink, A. Salibián, *Hematological parameters in Bufo arenarum injected with sublethal dose of Pb acetate*, „Biomedical and Environmental Sciences” 1998, nr 11.

²⁷ M. E. Chiesa, C. E. Rosenberg, N. E. Fink, A. Salibián, op. cit.

²⁸ N. E. Fink, A. Selibán, *Toxicological studies in adult amphibians: Effects of lead*, „Applied Herpetology” 2005, nr 2.

²⁹ M. A. Arieta, L. Bruzzzone, C. Apartin, C. E. Rosenberg, N. E. Fink, A. Salibián, *Bio-sensors of inorganic lead exposure and effect in an adult amphibian*, „Archives of Environmental Contamination and Toxicology” 2004, nr 46.

³⁰ M. A. Arieta, S. I. Perí, C. Apartin, C. E. Rosenberg, N. E. Fink, A. Salibián, *Blood lead concentration and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in adult Bufo arenarum*. „Archives of Physiology and Biochemistry” 2000, nr 108; C. E. Rosenberg, S. I. Per, M. A. Arrieta, N. E. Fink, A. Salibián, *Red blood cell osmotic fragility in Bufo arenarum exposed to Pb*, „Archives of Physiology and Biochemistry” 1998, nr 106.

³¹ L. Patric, *Lead Toxicity Part II...*, op. cit.

³² S. R. V. Raghavan, B. C. Culver, C. Gonik, *Erythrocyte lead-binding protein after occupational exposure*, „Environmental Research” 1980, nr 22.

2.1.3. Aktywność dehydratazy kwasu δ -aminolewulinowego

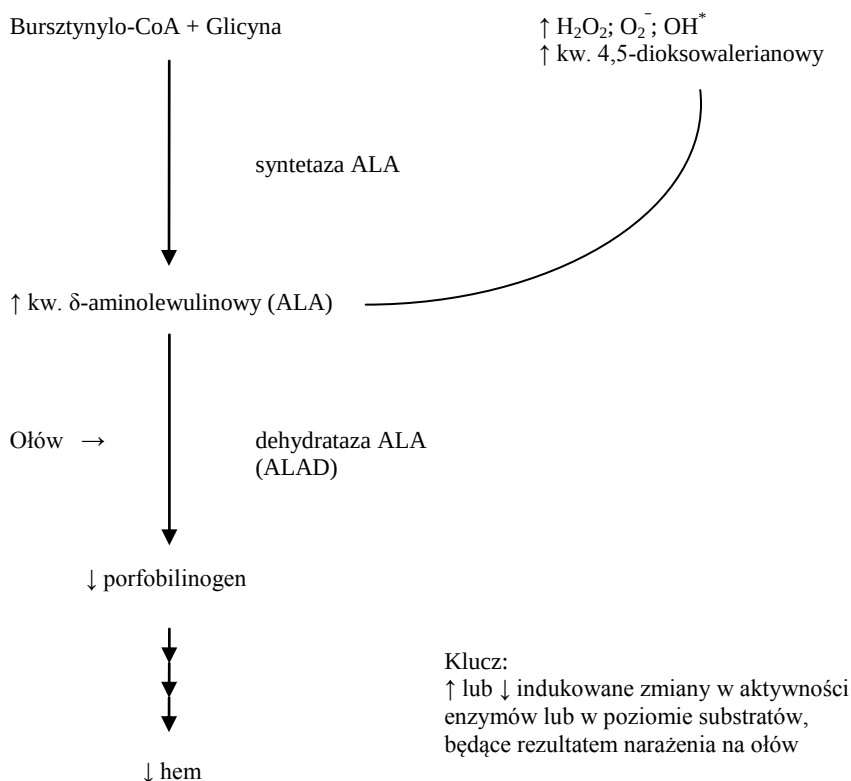
Ołów zaburza szlak syntezy hemu poprzez hamowanie dehydratazy kwasu δ -aminolewulinowego (ALAD). To przyczynia się do podwyższenia poziomu kwasu δ -aminolewulinowego (ALA) i zahamowania jego dalszej przemiany w porfobilinogen. ALA przenika przez barierę krew-mózg i może uszkadzać centralny system nerwowy. Jego neurotoksyczne działanie związane jest z powstawaniem stresu oksydacyjnego i tworzeniem w obecności tlenu (oraz jonów żelaza lub miedzi) rodnika ALA^* i anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^*). Kwas δ -aminolewulinowy wchodzi również w obecności tlenu w reakcje z oksyhemoglobina, w wyniku której powstaje methemoglobina i nadtlenek wodoru (H_2O_2). Dalsze reakcje chemiczne zachodzące pomiędzy produktami prowadzą do wytworzenia rodnika hydroksylowego (OH^*) najbardziej reaktywnego z wolnych rodników (Ryc. 1)³³. ALA może być też utleniany do kwasu 4,5-dioksowalerianowego, potencjalnie genotoksycznego związku, który prowadzi do powstawania mutacji w DNA³⁴. W dalszych etapach biosyntezy hemu ALA powinien być przekształcony do porfobilinogenu, a następnie po reakcjach deaminacji i dekarboksylacji do koproporfirynogenu III. Końcowe reakcje syntezy hemu (utlenianie łańcucha bocznego i dehydrogenacja) również mogą być modyfikowane przez jony ołowiu, który hamuje przyłączanie jonów żelaza do pierścienia protoporfirynowego, a to prowadzi do nagromadzenia żelaza, które na drodze reakcji Fentona bierze udział w tworzeniu groźnych wolnych rodników tlenowych³⁵, może również wiązać się do grup tiolowych ferrochelatazy, uniemożliwiając przekształcenie protoporfiryny IX w hem.

³³ G. H. El-Sokkary, G. H. Abdel-Rahman, E. S. Kamel, *Melatonin protects against lead-induced hepatic and renal toxicity in male rats*, 'Toxicology' 2005, nr 213; L. Patric, *Lead Toxicity Part II...*, op. cit.

³⁴ Ibidem.

³⁵ A. Boguszevska, K. Pasternak, *Ołów – wpływ na procesy biochemiczne w organizmie ludzkim*, „Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonia” 2004, nr 59.

Ryc. 1. Wpływ ołowiu na syntezę hemu



Źródło: L. Patric, *Lead Toxicity Part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in pathology and treatment of lead toxicity*, „Alternative Medicine Review” 2006, nr 11.

Zakłócenie syntezy hemu (hamowanie ALAD) powoduje wzrost stężenia porfiryn we krwi i obniżenie ilości hemoglobiny³⁶, co połączone z obniżoną liczbą erytrocytów powoduje spadek wartości hematokrytu. Dlatego też wskaźnikiem toksyczności ołowiu może być ilość protoporfiryn uwalnianych w efekcie rozpadu erytrocytów.

³⁶ L. Patric, *Lead Toxicity Part II...*, op. cit.

2.2. UKŁAD IMMUNOLOGICZNY

Układ immunologiczny płazów jest podobny do układu immunologicznego ssaków³⁷, chociaż u niższych kręgowców wydaje się, że jest on bardziej wrażliwy na różne czynniki, takie jak np. sezonowe zmiany temperatury³⁸ czy obecność pestycydów³⁹. Podczas prowadzenia wielu badań na modelach zwierzęcych udowodniono toksyczny wpływ ołowiu na humoralną i komórkową odpowiedź organizmu⁴⁰. Jego działanie immunomodulacyjne zależy od stężenia ołowiu i czasu kontaktu. Wykazano, że poziom ołowiu w środowisku naturalnym wpływa na zmianę funkcji układu immunologicznego. W organizmach ssaków po narażeniu na działanie metalu (zakres stężeń Pb: 1,2 μM –115 μM) *in vitro* i *in vivo* w komórkach z segmentowanym jądrem (PMN) obniżeniu uległa chemotaktyczna i niezależna od receptorów aktywność fagocytarna⁴¹. Zaburzona jest funkcja makrofagów⁴², gdyż ołów, uszkadzając struktury wewnątrzkomórkowe, inaktywuje endotoksyny i hamuje aktywność enzymów z grupą –SH⁴³. Bardzo mało wiadomo o skutkach, jakie wywołuje ołów w układzie immunologicznym dorosłych płazów. Rosenberg i współpracownicy (2003)⁴⁴ po podaniu ołowiu (pojedyncza dawka octanu ołowiu, 100 mg/kg) zaobserwowali w komórkach ropuch z gatunku *B. arenarum* spadek aktywności fagocytozy, która była niższa od oznaczonej dla komórek PMN człowieka⁴⁵, ale z kolei aktywność lityczna była wyższa u płazów. Może być to wynikiem wydajniejszego przebiegu procesu litycznego, wynikającego z braku bardziej wyspecjalizowanych mechanizmów, np. takich, jakie obecne są u ssaków. Po zakończonym eksperymencie aktywność fagocytozy była odwrotnie proporcjonalna do stężenia ołowiu we krwi zwierząt⁴⁶.

³⁷ L. A. Rollins-Smith, B. D. Hopkins, L. K. Reinert, *An amphibian model to test effect of xenobiotic chemicals on development of the hematopoietic system*, „Environmental Toxicology & Chemistry” 2004, nr 23.

³⁸ A. G. Zapata, A. Varas, M. Torroba, *Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates*, „Immunology Today” 1992, nr 13.

³⁹ M. K. Gilbertson, G. D. Hafner, K. G. Drouillard, A. Albert, B. Dixon, *Immuno-suppression in the Northern leopard frog (Rana pipiens) induced by pesticide exposure*, „Environmental Toxicology & Chemistry” 2003, nr 22.

⁴⁰ M. J. McCabe, *Lead*, [w:] *Immunotoxicology of Environment and Occupational Metals*, eds. J. T. Zelikoff, P. T. Thomas, London 1998, s. 111–129.

⁴¹ M. Governa, M. Valentino, I. Visona, *In vitro impairment of human granulocyte functions by lead*, „Archives of Toxicology” 1987, nr 6.

⁴² B. Jeremin, B. Bogdanowicz, *Wpływ ołowiu na stan i funkcję układu odpornościowego*, „Wiadomości Lekarskie” 1991, 44 (3/4); M. Wahedi, *Heavy metals-induced autoimmunity: a possible role for lead*, „Central European Journal of Immunology” 2000, nr 25.

⁴³ M. Wahedi, op. cit.

⁴⁴ C. E. Rosenberg, N. E. Fink, M. A. Arrieta, A. Salibián, op. cit.

⁴⁵ E. N. Fink de Cabutti, V. H. Morales, C. Jmelnitzky, J. A. Basualdo Farjat, R. de Torres, *Aspectos inmunológicos en portadores crónicos asintomáticos del HbA_{1c}*, „Sangre” 1984, nr 29.

⁴⁶ C. L. Rowe, W. A. Hopkins, V. R. Coffman, op. cit.

Zmiennocieplne kręgowce wytwarzają przeciwciała podobne w strukturze i różnorodności do przeciwciał wytwarzanych przez ssaki⁴⁷. Płazy są w stanie wytwarzać przeciwciała skierowane przeciwko kilku antygenom, uczestniczącym w odpowiedzi anafilaktycznej oraz w procesie odrzucania przeszczepu⁴⁸. Autoimmunizacja i procesy alergiczne mogą być spowodowane zaburzeniami odpowiedzi immunologicznej. Obecność naturalnej hemaglutyniny została opisana w osoczu ropuchy z gatunku *Bufo regularis* w 1976 roku⁴⁹. Jurd i współpracownicy (1978)⁵⁰ pokazali, że osocze dorosłych osobników z rodzaju *Xenopus* zawiera naturalny czynnik umożliwiający lizę i aglutynację RBC z innych gatunków. Fink i Selibàn (2005)⁵¹ przedstawili eksperymentalny dowód na powiązanie wpływu toksyczności ołowiu z indukowaną odpowiedzią immunologiczną. W osoczu dorosłych *B. arenarum* mierzono poziom aglutynin (przeciwciał biorących udział w zlepianiu aglutynogenów podczas aglutynacji) do heterologicznych krwinek czerwonych. Zaobserwowano, że produkcja naturalnych przeciwciał w osoczu ropuch narażonych na działanie ołowiu (50mg Pb/kg *tydzień; przez 6 tygodni) wzrosła o 39% oraz jednocześnie zaobserwowano 142% wzrost stężenia ołowiu we krwi. W grupie zwierząt kontrolnych nie zaobserwowano istotnego statystycznie wzrostu miana przeciwciał, podczas gdy stężenie ołowiu obniżyło się o 49%. Przedstawione wyniki sugerują, że ołów indukuje poprawę współoddziaływania limfocytów B i T prowadzący do obserwowanego wzrostu różnicowania limfocytów B⁵².

2.3. FRAKCJA BIAŁEK OSOCZA

Białka surowicy pobrane od *B. arenurum*, po sześciotygodniowym, stałym podawaniu octanu ołowiu w dawce 50 mg/kg, podlegały ocenie profilu białkowego⁵³. Elektroforetyczny rozdział białek surowicy wykazał obecność 4 frakcji – frakcję albuminy i trzy kolejne frakcje globulinowe, oznaczane zgodnie ze wzrastającą masą cząsteczkową jako G1, G2 i G3. Ołów spowodował znaczące obni-

⁴⁷ S. F. Schluter, R. M. Bernstein, J. J. Marchalonis, *Molecular origins ad evolution of immunoglobulin heavy-chain genes of jawed verterbrates*, „Immunology Today” 1997, nr 18.

⁴⁸ L. Du Pasquier, *The immune system of invertebrates and vertebrates*, „Comparative Biochemistry and Physiology” 2001, nr 129.

⁴⁹ P. Balding, E. R. Gold, *The natural heterohemoagglutinin in the serum of the toad Bufo regularis and its relationship to lower vertebrate immunoglobulins*, „Immunology” 1976, nr 30.

⁵⁰ R. D. Jurd, *A natural heterohaemagglutinin in Xenopus laevis serum*, „Immunology” 1987, nr 34.

⁵¹ N. E. Fink, A. Selibàn, op. cit.

⁵² M. J. McCabe, D. A. Lawrence, *The heavy metal lead exhibits B cell-stimulatory factor by enhancing B cell Ia expression and differentiation*, „Journal of Immunology” 1990, nr 145.

⁵³ F. Bertini, J. M. Cei, *Observaciones electroforéticas en seroproteínas de poblaciones argentinas de Bufo arenarum Hensel*, „Review of Society Argent Biology” 1960, nr 36.

zenie stężenia białka całkowitego i frakcji albuminy. Wśród frakcji globulinowych frakcja G3 uległa powiększaniu. Te wyniki można powiązać z wpływem ołowiu na hepatocyty ropuchy, funkcję jej nerek i układu immunologicznego. Chroniczna ekspozycja na działanie ołowiu powoduje niekorzystny wpływ na komórki wątroby, prowadząc do niewydolności funkcjonalnej hepatocytów⁵⁴. Ołów wykazuje działanie nefrotoksyczne, co również może tłumaczyć obserwowane zjawisko obniżenia się stężenia białka całkowitego oraz albuminy. Wyniki te obrazują toksyczny efekt, jaki ołów wywiera na dwa główne organy odpowiedzialne za procesy detoksykacyjne organizmu, tj. wątrobę i nerki.

3. PŁAZY JAKO BIOINDYKATORY

Płazy stanowią bardzo dobry model w badaniach toksykologicznych i ekotoksykologicznych. Organizmy te są bioindykatorami skażenia środowiska⁵⁵. Spowodowane jest to ich dwufazowym cyklem życiowym, obejmującym wodne stadium larwy, która po metamorfozie przybiera dorosłą postać, a ta z kolei może prowadzić życie wodne, wodno-ładowe lub lądowe. Larwy, jako organizmy zależne tylko i wyłącznie od środowiska wodnego, są bardziej wrażliwe na toksyny, szczególnie w początkowych stadiach rozwoju. Relatywnie mały rozmiar płazów i zdolność przystosowania do panujących warunków czyni tę grupę wyjątkowo dogodną do prowadzenia różnych badań laboratoryjnych⁵⁶. Warty zaznaczenia jest fakt, że w zbiornikach słodkowodnych płazy nie piją wody, więc pobieranie ksenobiotyków i toksyn rozpuszczonych w wodzie ograniczone jest tylko i wyłącznie do transportu przez skórę. Duża powierzchnia kontaktu płazów ze środowiskiem zewnętrznym umożliwia transport (aktywny i pasywny) zanieczyszczeń i ksenobiotyków do ich organizmu oraz wymianę gazową i jonową⁵⁷. Co więcej, płazy są kręgowcami zmiennocieplnymi, mającymi szeroki zakres tolerancji termicznej, a słabo wykształcone mechanizmy obronne takiego organizmu są dodatkową zaletą przy projektowaniu i realizacji badań porównawczych, dotyczących przystosowywania się organizmów do różnych, często niekorzystnych warunków środowiskowych.

Obserwowana duża tolerancja płazów na działanie ołowiu może być konsekwencją różnych wyrównawczych zmian zachodzących w ich organizmach,

⁵⁴ G. M. Williams, M. J. Iatropoulos, op. cit.

⁵⁵ L. K. Haywood, G. J. Alexander, M. J. Byrne, E. Cukrowska, *Xenopus laevis* embryos and tadpoles as models for testing for pollution by zinc, copper, lead and cadmium, „African Zoology” 2004, nr 39.

⁵⁶ N. E. Fink, A. Selibàn, op. cit.

⁵⁷ R. G. Boutilier, D. F. Stiffler, D. P. Toews, *Exchange of respiratory gases, ions, and water in amphibious and aquatic amphibians*, [w:] *Environmental Physiology of the Amphibians*, eds. M. E. Feder, W. W. Burggren, Chicago 1992; W. W. Burggren, J. J. Just, *Developmental changes in physiological systems*, [w:] *Environmental Physiology of the Amphibians*, eds. M. E. Feder, W. W. Burggren, Chicago 1992.

będących odpowiedzią na stale utrzymujące się, niekorzystne warunki środowiskowe⁵⁸. Genetyczne zmiany w genomie płazów⁵⁹ mogą zwiększać ich szansę na przeżycie poprzez wzrost wydajności procesów metabolicznych odpowiadających za proces detoksykacji metali ciężkich, na przykład poprzez zmianę aktywności i/lub struktury kluczowych enzymów tych szlaków.

Warto również zaznaczyć, że płazy w ich środowisku bytowania nie są narażone selektywnie tylko na jedną toksynę, ale na całą ich gamę. Biorąc tylko pod uwagę nieurbanizowane tereny, czynnikami środowiskowymi, które mogą wywołać u płazów stres środowiskowy, są mieszaniny złożonych czynników chemicznych, fizycznych i biologicznych. Wiele z nich jest pochodzenia antropogenicznego. W celu przystosowania się do tych niekorzystnych czynników środowiskowych zwierzęta zmuszone były osiąść homeostatyczną zdolność do redukcji złożonych skutków wielorakich zanieczyszczeń.

PODSUMOWANIE

Ołów jest metalem bardzo toksycznym dla organizmów żywych. Do organizmów zwierzęcych i ludzkiego może się on przedostawać przez powłoki skórne oraz układ oddechowy i pokarmowy. Występuje w organizmie w dwóch pulach: szybko-wymiennej (krew, tkanki miękkie) i wolno-wymiennej (kości). W naczyniach krwionośnych występuje głównie w erytrocytach (ok. 75 %), oraz w połączeniu z albuminą, która transportuje jony ołowiu do poszczególnych tkanek: mózgu, nerek, wątroby, mięśni szkieletowych i serca. Toksyczny wpływ ołowiu jest wielokierunkowy: zmienia aktywność wielu enzymów poprzez wiązanie się z grupami sulfhydrylowymi (-SH), aminowymi i karboksylowymi, do których wykazuje bardzo duże powinowactwo, zmienia właściwości białek w komórce, prowadząc do destabilizacji procesów metabolicznych (metabolizm energetyczny i anaboliczny), ma wpływ na tworzenie wolnych rodników tlenowych, powstanie zjawiska stresu oksydacyjnego, co w efekcie prowadzi do uszkodzeń wewnątrzkomórkowych i jest przyczyną powstawania licznych dysfunkcji.

⁵⁸ N. E. Fink, A. Selibàn, op. cit.

⁵⁹ M. Mulvey, S. A. Diamond, *Genetic factors and tolerance acquisition in population exposed to metals and metalloids*, [w:] *Metal Ecotoxicology. Concepts and Applications*, eds. M. C. Newman, A. W. McIntosh, Chelsea (Michigan) 1991, s. 301–321.

RESPONSE OF AMPHIBIANS TO THE PRESENCE OF LEAD IONS IN WATER

A contamination of the natural environment is the main problem of the contemporary world. Heavy metal ions are environmentally persistent toxins. A lead-related pathologies (including neurological, hematological, reproductive, circulatory, and immunological pathologies) are the direct result of the oxidative effect of the lead on tissues and cellular components and the generation of reactive oxygen species that decrease level of the available sulfhydryl groups, the antioxidant reserves, can cause nucleic acids damage and initiate lipid peroxidation in cellular membrane. Through binding to thiol groups of allosteric proteins, lead ions can provoke allosteric transition between active and inactive forms. The exposure to heavy metal ions is a direct factor in high mortality rate among amphibians. These animals can become indicators of environmental pollution. The main aim of this paper is to review and summarize the results of performed studies concerning physiological, biochemical and immunological changes in anuran amphibians exposed to the effects of lead ions.

WYKAZ SKRÓTÓW

ALA	kwasy δ-aminolewulinowy
ALAD	dehydratazy kwasu δ-aminolewulinowego
LD50	dawka letalna 50%
PMN	komórki z segmentowanym jądrem
RBC	krwinki czerwone
WBC	krwinki białe
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa

BIBLIOGRAFIA

1. Arieta M. A., Peri S. I., Apartín C., Rosenberg C. E., Fink N. E., Salibián A., *Blood lead concentration and δ-aminolevulinic acid dehydratase activity in adult Bufo arenarum*, „Archives of Physiology and Biochemistry” 2000, nr 108.
2. Arieta M. A., Bruzzzone L., Apartín C., Rosenberg C. E., Fink N. E., Salibián A., *Biosensors of inorganic lead exposure and effect in an adult amphibian*, „Archives of Environmental Contamination and Toxicology” 2004, nr 46.
3. Balding P., Gold E. R., *The natural heterohemoagglutinin in the serum of the toad Bufo regularis and its relationship to lower vertebrate immunoglobulins*, „Immunology” 1976, nr 30.
4. Barabowska-Bosiacka I., Chlubek D., *Biochemiczne mechanizmy neurotoksycznego działania ołowiu*, „Postępy Biochemii” 2006, nr 52.
5. Bertini F., Cei J. M., *Observaciones electroforéticas en seroproteínas de poblaciones argentinas de Bufo arenarum Hensel*, „Review of Society Argent Biology” 1960, nr 36.
6. Berzins D. W., Bundy K. J., *Bioaccumulation of lead in Xenopus laevis tadpoles from water and sediment*, „Environment International” 2002, nr 28.
7. Birdsall C. W., Grue C. E., Anderson A., *Lead contamination in bullfrog Rana catesbeiana and green frog R. clamitans tadpoles inhabiting highway drainages*, „Environmental Pollution” 1986, nr 40A.

8. Boguszewska A., Pasternak K., *Olów – wpływ na procesy biochemiczne w organizmie ludzkim*, „Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonia” 2004, nr 59.
9. Boutillier R. G., Stiffler D. F., Toews D. P., *Exchange of respiratory gases, ions, and water in amphibious and aquatic amphibians*, „Environmental Physiology of the Amphibians” 1992.
10. Burggren W. W., Just J. J., *Developmental changes in physiological systems*, „Environmental Physiology of the Amphibians” 1992.
11. Caspers M. L., Siegl G. J., *Inhibition by lead of human erythrocyte (Na⁺/K⁺) Adenosine triphosphatase associated with binding of 210Pb to membrane fragments*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1980, nr 600.
12. Chiesa M. E., Rosenberg C. E., Fink N. E., Salibián A., *Serum protein profile and blood cell counts in adult toads Bufo arenarum (Amphibia: Anura: Bufonidae): Effects of sublethal lead acetate*, „Archives of Environmental Contamination and Toxicology” 2006, nr 50.
13. Daniell W. E., Stockbridge H. L., Labbe R. F., Woods J. S., Anderson K. E., Bissell D. M., Bloomer J. R., Ellefson R. D., Moore M. R., Pierach C. A., Schreiber W. E., Tefferi A., Franklin G. M., *Environmental chemical exposures and disturbances of heme synthesis*, „Environmental Health Perspectives” 1997, nr 105.
14. Davic R. D., Gallati W. W., *Erythrocyte number in three species of northern Appalachian Desmognathus (Amphibia, Urodela, Plethodonitidae)*, „Journal of Herpetology” 1979, nr 13.
15. Du Pasquier L., *The immune system of invertebrates and vertebrates*, „Comparative Biochemistry and Physiology” 2001, nr 129.
16. El-Sokkary G. H., Abdel-Rahman G. H., Kamel E. S., *Melatonin protects against lead-induced hepatic and renal toxicity in male rats*, „Toxicology” 2005, nr 213.
17. Fink N. E., Selibán A., *Toxicological studies in adult amphibians: Effects of lead*, „Applied Herpetology” 2005, nr 2.
18. Fink de Cabutti E. N., Morales V. H., Jmelnitzky C., Basualdo Farjat J. A., de Torres R., *Aspectos inmunológicos en portadores crónicos asintomáticos del HbdAg*, „Sangre” 1984, nr 29.
19. Fragou D., Fragou A., Kouidou S., Njau S., Kovatsi L., *Epigenetic mechanism in metal toxicity*, „Toxicology Mechanism and Methods” 2011, nr 21.
20. Gilbertson M. K., Hafner G. D., Drouillard K. G., Albert A., Dixon B., *Immunosuppression in the Northern leopard frog (Rana pipiens) induced by pesticide exposure*, „Environmental Toxicology & Chemistry” 2003, nr 22.
21. Governa M., Valentino M., Visona I., *In vitro impairment of human granulocyte functions by lead*, „Archives of Toxicology” 1987, nr 6.
22. Gurer H., Ercal N., *Can antioxidants be beneficial in the treatment of lead poisoning?*, „Free Radical Biology & Medicine” 2000, nr 29.
23. Hadji-Azimi I., Coosemans V., Canicatti C., *Atlas of adult Xenopus laevis laevis hematology*, „Developmental & Comparative Immunology” 1987, nr 11.
24. Haywood L. K., Alexander G. J., Byrne M. J., Cukrowska E., *Xenopus laevis embryos and tadpoles as models for testing for pollution by zinc, copper, lead and cadmium*, „African Zoology” 2004, nr 39.
25. Houlahan J. E., Findlay C. S., Schmidt B. R., Meyer A. H., Kuzmin S. L., *Quantitative evidence for global amphibian population declines*, „Nature” 2000, nr 404.
26. Ireland M. P., *Lead retention in toads Xenopus laevis fed increasing levels of lead-contaminated earthworms*, „Environmental Pollution” 1977, nr 12.
27. Jeremin B., Bogdanowicz B., *Wpływ ołowiu na stan i funkcję układu odpornościowego*, „Wiadomości Lekarskie” 1991, nr 44 (3/4).

28. Jurd R. D., *A natural heterohaemagglutinin in Xenopus laevis serum*, „Immunology” 1987, nr 34.
29. Kowalak A., *Metale śmierci*, Centrum Edukacji Ekologicznej Wsi, Krosno 1991
30. Linder G., Grillitsch B., *Ecotoxicology of metals*, [w:] *Environmental of amphibian and reptiles*, eds. D. W. Sparling, G. Linder, C. A. Bishop, Pensacola 2000, s. 325–459.
31. Lombourdis N. S., Wray D., *Heavy-metal concentration in the frog Rana ridibunda from a small river of Macedonia, Northern Greece*, „Environmental International” 1998, nr 24.
32. Mann R., Bidwell J., *Toxicological issues for amphibians in Australia*, [w:] *Declines and Disappearances of Australian Frogs*, ed. A. Campbell, Canberra 1999, s. 185–201.
33. Martynowicz H., Andrzejak R., Mędraś M., *Wpływ ołowiu na funkcje gonad męskich*, „Medycyna Pracy” 2005, nr 56.
34. McCabe M. J., *Lead*, [w:] *Immunotoxicology of Environment and Occupational Metals*, eds. J. T. Zelikoff, P. T. Thomas, London 1998, s. 111–129.
35. McCabe M. J., Lawrence D. A., *The heavy metal lead exhibits B cell-stimulatory factor by enhancing B cell Ia expression and differentiation*, „Journal of Immunology” 1990, nr 145.
36. Mulvey M., Diamond S. A., *Genetic factor and tolerance acquisition in population exposed to metals and metalloids*, [w:] *Metal Ecotoxicology. Concepts and Applications*, eds. M. C. Newman, A. W. McIntosh, Chelsea (Michigan) 1991, s. 301–321.
37. Newman M. C., Unger M. A., *Fundamentals of Ecotoxicology*, Boca Raton 2003.
38. Patric L., *Lead toxicity, a review of the literature. Part I: exposure, evaluation and treatment*, „Alternative Medicine Review” 2006, nr 11.
39. Patric L., *Lead Toxicity Part II: The role of free radical damage and the use of antioxidants in pathology and treatment of lead toxicity*, „Alternative Medicine Review” 2006, nr 11.
40. Peri S. I., Fink N. E., Salibián A., *Hematological parameters in Bufo arenarum injected with sublethal dose of Pb acetate*, „Biomedical and Environmental Sciences” 1998, nr 11.
41. Quig D., *Cysteine Metabolism and Metal Toxicity*, „Alternative Medicine Review” 1998, nr 3.
42. Raghavan S. R. V., Culver B. C., Gonik C., *Erythrocyte lead-binding protein after occupational exposure*, „Environmental Research” 1980, nr 22.
43. Rollins-Smith L. A., Hopkins B. D., Reinert L. K., *An amphibian model to test effect of xenobiotic chemicals on development of the hematopoietic system*, „Environmental Toxicology & Chemistry” 2004, nr 23.
44. Rosenberg C. E., Per S. I., Arrieta M. A., Fink N. E., Salibián A., *Red blood cell osmotic fragility in Bufo arenarum exposed to Pb*, „Archives of Physiology and Biochemistry” 1998, nr 106.
45. Rosenberg C. E., Fink N. E., Arrieta M. A., Salibián A., *Effect of lead acetate on the in vitro engulfment and killing capability of the toad (Bufo arenarum) neutrophils*, „Comparative Biochemistry and Physiology” 2003, nr 136C.
46. Rowe C. L., Hopkins W. A., Coffman V. R., *Failed recruitment of Southern toads (Bufo terrestris) in trace element-contaminated breeding habitat: direct and indirect effect that may lead to a local population sink*, „Archives of Environmental Contamination and Toxicology” 2003, nr 40.
47. Schluter S. F., Bernstein R. M., Marchalonis J. J., *Molecular origins ad evolution of immunoglobulin heavy-chain genes of jawed verterbrates*, „Immunology Today” 1997, nr 18.
48. Sharma S. S., Dietz K. J., *The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance*, „Trends in Plant Science” 2009, nr 14.
49. Skoczyńska A., Poręba R., Sieradzki A., Andrzejak R., Sieradzka U., *Wpływ ołowiu i kadmu na funkcje układu immunologicznego*, „Medycyna Pracy” 2002, nr 53.

50. Sobotka J. M., Radwan R. G., *Teratogenesis induced by short – and long-term exposure of Xenopus laevis progeny to lead*, „Journal of Toxicology and Environmental Health” 1995, nr 44.
51. Steele C. W., Stickler-Shaw S., Taylor D. H., *Failure of Bufo americanus tadpoles to avoid lead-enriched water*, „Journal of Herpetology” 1991, nr 25.
52. Stohs, S. J., Bagchi, D., *Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions*, „Free Radical Biology & Medicine” 1995, nr 18.
53. Szubarkowska E., Gromysz-Kalkowska K., Wójcik K., *Behavior of the fordem blond elements in Rana esculenta after repeated contacts of the animals with a therapeutic dose of foschlor*, „Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology” 1990, nr 45.
54. Valko M., Morris H., Cronin M. T., *Metals, toxicity and oxidative stress*, „Current Medicinal Chemistry” 2005, nr 12.
55. Varela M. E., Sellarés M. E., *Sobre la morfología hemática de Bufo arenarum (Hensel)*, „Review of Society Argent Biology” 1937, nr 13.
56. Wahedi M. *Heavy metals-induced autoimmunity: a possible role for lead*, „Central European Journal of Immunology” 2000, nr 25.
57. Williams G. M., Iatropoulos M. J., *Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity*, „Toxicologic Pathology” 2002, nr 30.
58. Yeung G. L., *The influence of lead and environmental pollutants on metamorphosis of Rana urticularia (Amphibia: Ranidae)*, „Proc. Ark. Academic Society” 1978, nr 32.
59. Zapata A. G., Varas A., Torroba M., *Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates*, „Immunology Today” 1992, nr 13.

MAGDALENA ŁUKASIEWICZ

(UNIwersytet Jagielloński)

UKŁADY LIPOSOM-POLIMER JAKO NOŚNIKI BIAŁEK ZAKOTWICZONYCH PRZES GPI

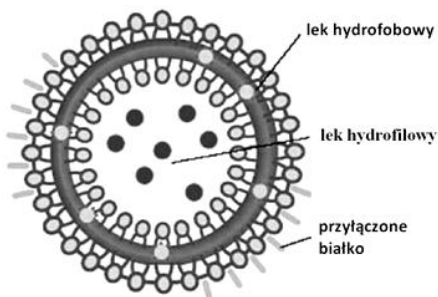
WSTĘP

Od lat osiemdziesiątych XX wieku obserwuje się intensywny rozwój nowej dziedziny wiedzy zwanej technologią liposomalną. Bazuje ona na zastosowaniu liposomów, czyli lipidowych pęcherzyków o rozmiarach nanometrycznych, które mają zdolność do zamykania oraz transportu substancji biologicznie aktywnych. Badania ostatnich kilku dziesięcioleci pokazały, że liposomy stanowią idealny rodzaj nośników praktycznie dla każdego typu substancji, zarówno tych, które są rozpuszczalne w wodzie, jak i tych, które rozpuszczają się w rozpuszczalnikach niepolarnych (środowisko hydrofobowe). Od końca lat siedemdziesiątych zaczęto prowadzić badania nad zamykaniem, a następnie kontrolowanym dostarczaniem białek, w tym białek mających zdolność wiązania się z dwuwarstwą lipidową nośnika. To, co stanowi obecnie wyzwanie dla naukowców, to próby zwiększenia stopnia enkapsulacji białka w liposomie, a także wzrost stabilności układu, tak by móc go w przyszłości zastosować w medycynie i farmakologii. W tym celu projektuje się układy określane mianem *l a y e r s o m e*, czyli liposomy (zawierające substancję biologicznie aktywną, np. białko) otoczone jedną lub kilkoma warstwami polimeru. Kolejnym wyzwaniem, poza zoptymalizowaniem stabilności pęcherzyka liposomalnego, jest utrzymanie na wystarczającym, terapeutycznym poziomie aktywności enzymatycznej zamykanego białka.

LIPOSOMY

Liposomy to pęcherzyki fosfolipidowe o rozmiarach nanometrycznych, powstające samoistnie z fosfolipidów. Ich utworzenie jest ściśle związane z kształtem cząsteczek lipidowych oraz minimalizacją energii brzegowej tworzącej się nanostruktury. Utworzony w ten sposób pęcherzyk jest termodynamicznie metastabilnym układem, którego stabilność jest ściśle determinowana siłą napięcia powierzchniowego¹. Formujący się w środowisku wodnym liposom zamyka pewną objętość roztworu, w którym może być rozpuszczona np. substancja terapeutyczna. Substancje aktywne mogą być zawarte nie tylko we wnętrzu liposomów (substancje hydrofilowe), ale także w dwuwarstwie lipidowej (substancje hydrofobowe). Do dwuwarstwy lipidowej mogą inkorporować także białka (Ryc. 1), jak np. białka kotwiczące przez specjalną, hydrofobową kotwicę glikozylofosfatydyloinozytolową określaną jako GPI. Zawiera ona w swej strukturze hydrofobowe łańcuchy węglowodorowe kwasów tłuszczowych związanych kowalencyjnie z grupami OH glicerolu.

Ryc. 1. Sposoby enkapsulacji substancji biologicznie aktywnych w liposomie



Zmodyfikowane na podstawie: <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1222>

Zarówno budowa warstwy lipidowej liposomów, jak i ich zdolność do zamykania w swym wnętrzu pewnych objętości roztworów stały się motorem rozwoju nowych kierunków badań. Badacze skupili się na dwóch najważniejszych aspektach:

¹ K. Stebelska, P. Wyrozumska, M. Grzybek, A. F. Sikorski, *Characterization and medical applications of liposome constructions*, „Advances in Clinical and Experimental Medicine” 2002, nr 11 (2), s. 229–242.

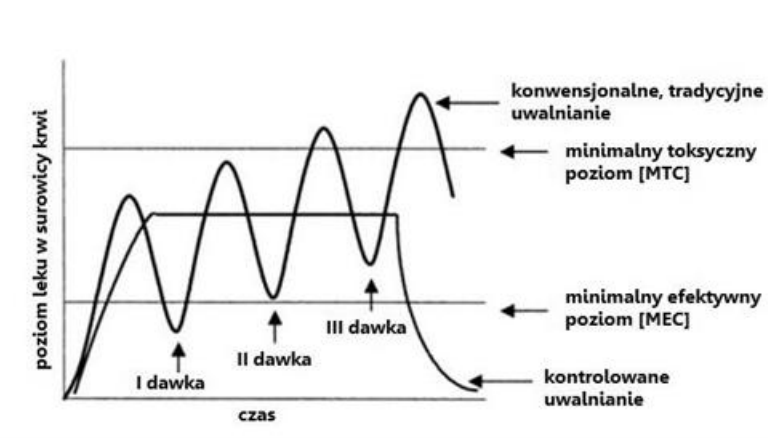
- na zastosowaniu liposomów jako układów do kontrolowanego uwalniania leków i innych substancji leczniczych biologicznie czynnych;
- na badaniach podstawowych właściwości dwuwarstwy lipidowej jako prostego modelu błony biologicznej.

Rozważając liposomy jako potencjalne nośniki substancji terapeutycznych należy zwrócić uwagę na cechy, jakimi powinien odznaczać się taki nośnik. Przede wszystkim powinien być:

- chemicznie i biologicznie nieaktywny;
- biokompatybilny;
- odporny mechanicznie;
- zdolny do transportu dużej ilości leku;
- zabezpieczony przez przypadkowym uwolnieniem substancji aktywnej;
- łatwy do dostarczania oraz łatwy do usunięcia z organizmu;
- łatwy w produkcji oraz sterylizacji.

Porównując profile konwencjonalnego oraz kontrolowanego dostarczania substancji biologicznie aktywnych (Ryc. 2), widać, że stały poziom leku w surowicy krwi udaje się utrzymać poprzez zastosowanie kontrolowanego uwalniania.

Ryc. 2. Porównanie profilu kontrolowanego dostarczania leku do profilu konwencjonalnego



Zmodyfikowane na podstawie: <http://www.globalspec.com/reference/78204/203279/chapter-22-design-of-controlled-release-drug-delivery%20systems>

Unika się w nim schodzenia poniżej minimalnego efektywnego stężenia leku (MEC), a także przekraczania minimalnego toksycznego poziomu (MTC). Niektóre substancje lecznicze posiadają dość wąskie okno terapeutyczne, w związku z tym dostarczanie leku często wiązało się z licznymi, poważnymi skutkami ubocznymi. Dzięki zastosowaniu liposomów, które uwalniają lek w sposób kontrolowany, można dopasować z dużo większą precyzją stężenie substancji aktywnej, tak aby zawierało się ono pomiędzy dwoma poziomami MEC oraz MTC.

Kolejną zaletą zastosowania liposomów jest **u k i e r u n k o w a n i e**. Oznacza to, że lek jest kierowany ściśle do miejsca swego przeznaczenia (kontrola przestrzenna). Dzięki temu ogranicza się ryzyko przedawkowania i występowania efektów ubocznych.

Trwają badania nad efektywnym zamykaniem i dostarczaniem białek oraz czynników wzrostu².

TRWAŁOŚĆ LIPOSOMÓW I METODY ICH STABILIZACJI

Ze względu na niską trwałość układów liposomalnych oraz dynamizm tworzonych przez fosfolipidy struktur (na co wpływają: obecność wiązań wodorowych pomiędzy grupami hydrofilowymi, oddziaływania dipol-dipol, wiązania van der Waalsa między cząsteczkami lipidowymi) przechowuje się je w ciemności, w atmosferze beztlenowej, w stanie zamrożonym, stosując przy tym antyutleniacze. Należy również nadmienić, że niestabilność pęcherzyków lipidowych jest bez wątpienia związana z ich rozmiarem. Wraz ze zmniejszeniem rozmiarów liposomów w ich strukturach pojawiają się coraz większe naprężenia. Skutkuje to pojawianiem się problemów w utrzymaniu integralności błony lipidowej, co w ostateczności prowadzi do jej pęknięcia. Po podaniu liposomów do organizmu zmieniają się diametralnie warunki. Gwałtowny wzrost temperatury czy oddziaływanie z białkami osocza skutkuje wzrostem destabilizacji układów liposomal-

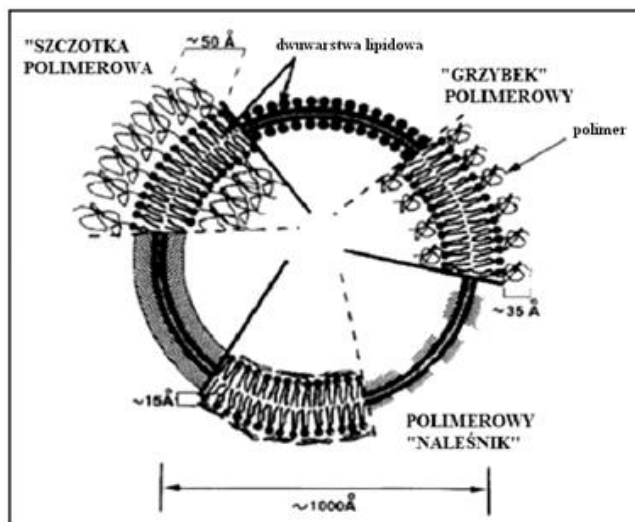
² L. Marquez, F. A. Mauad de Abreu, C. Ferreira, G. Alves, M. Miziara, J. Alves, *Enhanced bone healing of rat tooth sockets after administration of epidermal growth factor (EGF) carried by liposome*, „Injury” 2012, w druku; Q. Xiang, J. Xiao, H. Zhang, X. Zhang, M. Lu, H. Zhang, Z. Su, W. Zhao, C. Lin, Y. Huang, X. Li, *Preparation and characterisation of bFGF-encapsulated liposomes and evaluation of wound-healing activities in the rat*, „Burns” 2011, nr 37, s. 886–895; C. Feng, C. Zhang, X. Shao, Q. Liu, Y. Qian, L. Feng, J. Chen, Y. Zha, Q. Zhang, X. Jiang, *Enhancement of nose-to-brain delivery of basic fibroblast growth factor for improving rat memory impairments induced by co-injection of β -amyloid and ibotenic acid into the bilateral hippocampus*, „International Journal of Pharmaceutics” 2012, nr 423, s. 226–234; F. Ronzon, S. Morandat, B. Roux, M. Bortolato, *Insertion of a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Enzyme into Liposomes*, „The Journal of Membrane Biology” 2004, nr 197, s. 169–177; K. Suzuki, Y. Okumura, *GPI-Linked Proteins Do Not Transfer Spontaneously from Erythrocytes to Liposomes. New Aspects of Reorganization of the Cell Membrane*, „Biochemistry” 2000, nr 39, s. 9477–9485.

nych. Ponadto liposomy są wychwytywane przez układ siateczkowo-śródbłonkowy wątroby i śledziony. Inną metodą dezintegracji błony liposomów jest oddziaływanie z lipoproteinami o małej i dużej gęstości. W przypadku podania doustnego lipidy budujące liposomy są trawione w przewodzie pokarmowym, gdyż jako naturalnie występujące w organizmach żywych są traktowane jako składnik odżywczy. Aby poprawić właściwości tego typu układów, należy zwiększyć ich trwałość. W tym celu liposomy poddaje się³:

- modyfikacjom rozmiarów oraz ich potencjałów zeta;
- inkorporacji cholesterolu lub sfingomieliny, co wpływa na stopień uporządkowania oraz płynność dwuwarstwy lipidowej;
- procesowi przyłączania hydrofilowych cząstek, takich jak glikolipidy, polisacharydy czy syntetyczne polimery, dzięki czemu tworzy się cienka warstewka wody na powierzchni liposomu, co utrudnia adhezję białek osocza; tego typu liposomy noszą nazwę *Stealth* liposomów (Ryc. 3):

³ M. Ciobanu, B. Heurtault, C. Ruhlmann, C. D. Muller, B. Frisch, *Layersome: Development and optimization of stable liposomes as drug delivery system*, „International Journal of Pharmaceutics” 2007, nr 344, s. 154–157; S.-S. Feng, G. Ruan, Q.-T. Li, *Fabrication and characterizations of a novel drug delivery device liposomes-in-microsphere (LIM)*, „Biomaterials” 2004, nr 25, s. 5181–5189; M. Machuf, O. Regev, Y. Peled, J. Kost, S. Cohen, *Characterization of microencapsulated liposome system for the controlled delivery of liposome-associated macromolecules*, „Journal of Controlled Release” 1996, nr 43, s. 35–45; M. Xiaomei, Z. Zhensheng, *Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)-stabilized liposomes*, „International Journal of Pharmaceutics” 2006, nr 318, s. 55–61; H. Takeuchi, H. Yamamoto, T. Toyoda, H. Toyobuk, T. Hino, Y. Kawashima, *Physical stability of size controlled small unilamellar liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol*, „International Journal of Pharmaceutics” 1998, nr 164, s. 103–111; G. Angelini, S. Boncompagni, P. De Maria, A. Fontana, C. Gasbarri, G. Siani, *Kinetic evolution of the effect of layer by layer deposition of polyelectrolytes on the stability of POPC liposomes*, „Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects” 2008, nr 322, s. 234–238; M. L. Immordino, F. Dosio, L. Cattel, *Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential*, „International Journal of Nanomedicine”, September 2006, s. 297–315; D. Lasic, B. Ceh, *Stealth Liposomes: From Theory To Product*, „Advanced Drug Delivery Reviews” 1994, nr 24, s. 165–177.

Ryc. 3. Liposomy typu *Stealth*

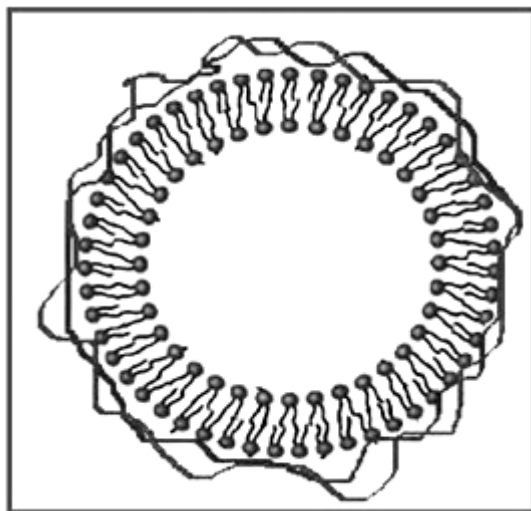


Zmodyfikowany na podstawie: <http://www.biotechnolog.pl/artykul-208.htm>

- tworzeniu układów *liposom-polymer*, czyli tzw. układów *layer-some*. Proces ten polega na pokrywaniu powierzchni liposomu polielektrolitem (Ryc. 4). Układy polimerowe stabilizujące pęcherzyki liposomalne mogą być zróżnicowane w zależności od tego, ile warstw polimerów jest naniesionych na liposom. Warstwy polielektrolitowe nanosi się najczęściej techniką *layer-by-layer* (LbL), czyli warstwa po warstwie. Jest to stosunkowo nowa metoda, cechująca się dużą prostotą, uniwersalnością oraz możliwością kontroli grubości filmu (można znaleźć liczbę kroków potrzebnych do adsorpcji filmu o danej grubości) w skali nanometrów. Metoda ta znalazła szerokie zastosowanie w nanotechnologii przy produkcji nanokompozytów, materiałów fotonicznych, w inżynierii genetycznej czy w biotechnologii⁴.

⁴ G. Decher, J. B. Schlenoff, *Multilayer thin films*, Wiley-VCH 2003.

Ryc. 4. Liposom typu *layersome* stabilizowany polielektrolitami



Źródło: Opracowanie własne

LIPOSOMY A ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA

Liposomy są stosowane do hamowania bądź wzmacniania odpowiedzi immunologicznej. Pełnią zatem funkcję adiuwantów. Idealny adiuwant powinien być bezpieczny oraz nietoksyczny. Ich powierzchnię można modyfikować za pomocą białek, w tym immunoglobulinami rozpoznawalnymi oraz wiążalnymi przez receptory i antygeny znajdujące się na powierzchni komórek⁵. Badania pokazują, że można przyłączać przeciwciała monoklonalne bezpośrednio do końców łańcuchów pochodnych PEG sterycznie stabilizowanych nośników liposomalnych⁶. Liposomy modyfikowane białkami znalazły zastosowanie w eksperymentach nad procesami prezentacji antygeny przez komórki APC (ang. Antigen presenting cells)⁷. Są one traktowane jako modele drobnoustrojów⁸. Przy-

⁵ K. Stebelska, P. Wyrozumska, M. Grzybek, A. F. Sikorski, op. cit., s. 229–242.

⁶ G. Bendas, A. Krause, U. Bakowsky, J. Vogel, U. Rothe, *Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique*, „International Journal of Pharmaceutics” 1999, nr 181, s. 79–93.

⁷ K. Stebelska, P. Wyrozumska, M. Grzybek, A. F. Sikorski, op. cit., s. 229–242.

⁸ T. Nakanishi, A. Hayashi, J. Kuniyawa, Y. Tsutsumi, K. Tanaka, Y. Yashiro Ohtani, M. Nakanishi, H. Fujiwara, T. Hamaoka, T. Mayumi, *Fusogenic liposomes efficiently deliver exogenous antigen through the cytoplasm into the MHC class I processing pathway*, „European Journal of Immunology” 2000, nr 30, s. 1740–1747.

kładowym związkiem immunosupresyjnym jest *metotrexat* (MTX). Jest on antagonistą kwasu foliowego, często stosowanym w chorobach nowotworowych bądź w mniejszych dawkach jako lek immunosupresyjny (hamujący lub zapobiegający aktywności układu immunologicznego). Badania pokazują, że enkapsulacja tego leku w liposomach pokrywanych albuminą surowicy bydlęcej (BSA) może modyfikować jego działanie, podnosząc bądź obniżając odpowiedź immunologiczną⁹.

BIĄŁKA KOTWICZĄCE PRZEZ GPI

Białka można podzielić według kilku kryteriów. Pierwszym z nich jest skład chemiczny, zgodnie z którym białka można sklasyfikować jako proste lub złożone. Do białek prostych (zawierających wyłącznie aminokwasy) należą histony, albuminy, globuliny oraz skleroproteiny. Do złożonych natomiast (zawierających tzw. grupy prostetyczne, czyli składnik niebiałkowy) zalicza się: metaloproteiny, glikoproteiny, nukleoproteiny, lipoproteiny, fosfoproteiny, chromoproteiny. Białka można podzielić także na podstawie pełnionych funkcji biologicznych na strukturalne, enzymy, hormony, transportowe itd.

Ze względu na strukturę białka można sklasyfikować jako globularne, włókniaste oraz błonowe¹⁰. Białka błonowe zawierają ugrupowania hydrofobowe, które w najprostszym przypadku są przyłączane kowalencyjnie do cząsteczki proteiny. Jednym z rodzajów białek błonowych są białka wiążące się z dwuwarstwą lipidową poprzez hydrofobowe łańcuchy węglowodorowe kwasów tłuszczowych. Łańcuchy te są związane kowalencyjnie z grupami hydroksylowymi glicerolu. Kotwica GPI jest dodawana do C-końca cząsteczki białka w posttranslacyjnej obróbce¹¹. Dzięki obecności ugrupowania wiążącego, kotwiczącego

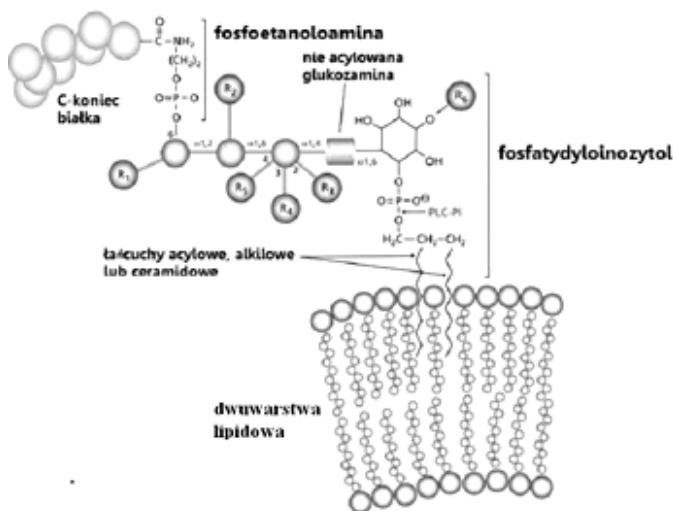
⁹ M. Zimecki, J. Artym, *Effect of methotrexate on the immune response in selected experimental models*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 2004, nr 58, s. 226–235.

¹⁰ H. Petty, *Characterization of Cellular Proteins*, „Current Protocols in Cell Biology” 1998, s. 5.1.1–5.1.10.

¹¹ O. Nosjean, A. Briolay, B. Roux, *Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1997, nr 1331, s. 153–186; *GPI-anchored biomolecules an Overview*, in *GPI-anchored membrane proteins and carbohydrates*, eds. D. C. Hoessli, S. Ilanumaran, 1999, s. 1–14; M. A. Ferguson, *The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research*, „Journal of Cell Science” 1999, nr 112, s. 2799–2809; M. A. Ferguson, S. W. Homans, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, *Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein to the membrane*, „Science” 1988, nr 239, s. 753–759; M. A. Ferguson, M. G. Low, G. A. Cross, *Glycosylsn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein*, „The Journal of Biological Chemistry” 1985, nr 260, s. 14547–14555; S. W. Homans, M. A. Ferguson, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, R. Anand, A. F. Williams, *Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein*, „Nature” 1988, nr 333, s. 269–272.

w dwuwarstwie lipidowej, białka te występują na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej¹². Strukturę ugrupowania glikozylofosfatydylinozytolu przedstawiono na poniższym schemacie (Ryc. 5).

Ryc. 5. Schemat ugrupowania glikozylofosfatydylinozytolowego



Zmodyfikowany na podstawie: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/post-translational-analysis/glycosylation/structures-symbols/gpi-anchor-structure.html>

Czynnikiem separującym białko GPI od dwuwarstwy lipidowej jest fosfolipaza C. Dzięki niej można kontrolować oraz regulować ilość przyłączonego/uwolnionego białka.

ROLA BIAŁEK WIĄŻĄCYCH SIĘ PRZEZ GLIKOZYLOFOSFATYDYLOINOZYTOL

Białka zawierające w swej strukturze ugrupowanie GPI występują u organizmów eukariotycznych, pełniąc tam różnorodne funkcje, w tym:

¹² M. A. Ferguson, *The structure, biosynthesis and functions...*, op. cit., s. 2799–2809; B. Eisenhaber, S. Maurer-Stroh, M. Novatchkova, G. Schneider, F. Eisenhaber, *Enzymes and auxiliary factors for GPI lipid anchor biosynthesis and post-translational transfer to proteins*, „BioEssays” 2003, nr 25, s. 367–385; A. Tiede, I. Bastisch, J. Schubert, P. Orlean, R. E. Schmidt, *Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes*, „The Journal of Biological Chemistry” 1999, nr 380, s. 503–523.

- e n z y m ó w, jak np. fosfataza alkaliczna biorąca udział w procesie b i o m i n e r a l i z a c j i kości czy acetylocholinesteraza rozkładająca neuroprzekąznik acetylocholinę;
- a n t y g e n ó w u ssaków, jak np. Thy-1 czy CD14;
- p r z e c i w c i a ł¹³.

CELE PRACY

Głównym celem pracy jest opracowanie stabilnych nanonośników liposomalnych, mających zastosowanie w kontrolowanym dostarczaniu białka fosfatazy alkalicznej (ALP). Prowadzone są badania nad polepszeniem stabilności układów *layersome* oraz utrzymaniem aktywności przyłączanego białka na dość wysokim, terapeutycznym poziomie. Białko to ma szerokie zastosowanie w farmakologii przy leczeniu sepsy wywoływanej endotoksynami produkowanymi przez bakterie Gram-ujemne¹⁴ czy w leczeniu hipofosfatazji¹⁵. W inżynierii tkankowej kości fosfataza alkaliczna pełni rolę promotora mineralizacji rusztek komórkowych¹⁶. Ze względu na obecność ugrupowania GPI administracja tego białka jest wyjątkowo ułatwiona poprzez zastosowanie liposomów jako nośników. Liposomy zapewniają długotrwałe, kontrolowane uwalnianie oraz wydłużają czas jego działania.

FOSFATAZA ALKALICZNA JAKO PRZYKŁAD BIAŁKA KOTWICZĄCEGO PRZEZ GPI

Fosfataza alkaliczna jest enzymem hydrolitycznym cechującym się brakiem swoistości¹⁷. Jest metaloproteiną posiadającą w swej strukturze dwie prawie identyczne podjednostki zawierające dwa jony cynku. Jeden z nich jest odpo-

¹³ E. W. Murray, S. M. Robbins, *Antibody Cross-linking of the Glycosylphosphatidylinositol-linked Protein CD59 on Hematopoietic Cells Induces Signaling Pathways Resembling Activation by Complement*, „The Journal of Biological Chemistry” 1998, nr 273 s. 25279–25284.

¹⁴ K. Poelstra, W. W. Bakker, P. A. Klok, M. J. Hardonk, D. K. Meijer, *A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification*, „Laboratory Investigation” 1997, nr 76, s. 319–327.

¹⁵ T. Nishioka, S. Tomatsu, M. A. Gutierrez, K. I. Miyamoto, G. G. Trandafirescu, P. L. C. Lopez et al., *Enhancement of drug delivery to bone: characterization of human tissue-nonspecific alkaline phosphatase tagged with an acidic oligopeptide*, „Molecular Genetics and Metabolism” 2006, nr 88, s. 244–255.

¹⁶ S. SooJee, L. Culver Y., Li, E. P. Douglas, L. B. Gower, *Biomimetic mineralization of collagen via an enzyme-aided PILP process*, „Journal of Crystal Growth” 2010, nr 312, s. 1249–1256.

¹⁷ P. Kopczyński, *Możliwości zastosowania wybranych markerów obrotu kostnego w stomatologii*, „Nowiny Lekarskie” 2004, nr 73, s. 318–320.

wiedzialny za utrzymanie stabilnej budowy białka, drugi natomiast odpowiada za aktywność enzymatyczną ALP. Dzięki zdolnościom hydrolitycznym fosfataza alkaliczna pełni funkcję katalizatora w reakcji hydrolizy estrów monofosforanowych. W jej wyniku uwalniany jest odpowiedni alkohol oraz cząsteczki kwasu fosforowego, które w organizmie występują w formie zjonizowanej. Maksimum aktywności enzymatycznej tego enzymu przypada na pH 9-10¹⁸. ALP bierze udział w transporcie metabolitów przez błonę komórkową¹⁹. Fosfataza alkaliczna dostarcza *in situ* fosforany pełniące funkcję w procesie biomineralizacji kości. Hydrolizie poddawane są cząsteczki ATP bądź substraty pirofosforanowe²⁰.

AKTYWNOŚĆ BIAŁKA

Z punktu widzenia zastosowania białek w kontrolowanym dostarczaniu istotnym faktem jest zachowanie przez nie swojego stanu natywnego. W tym celu wyznacza się tak zwaną aktywność enzymatyczną mierzoną jako liczba moli substratu, która została przekształcona w produkt w jednostce czasu oraz w odpowiednich warunkach reakcji enzymatycznej²¹. By oszacować wpływ nośnika liposomalnego na aktywność przyłączanego białka, przeprowadza się pomiary porównawcze: wyznacza się aktywność enzymatyczną nieprzyłączonej proteiny (traktowanej jako odnośnik, którego aktywność enzymatyczna stanowi 100%) zawierającej grupę GPI oraz aktywność dla proteiny zakotwiczonej w liposomie poprzez glikozylofosfatydilinozytol. Podobne testy przeprowadza się także dla układów *layersome* zawierających to białko. Dzięki temu można porównać, jak zmieniała się wartość aktywności zamykanego białka początkowo po przyłączeniu go do dwuwarstwy pęcherzyka lipidowego, a następnie po pokryciu warstwą (warstwami) polielektrolitu (polielektrolitów).

W przypadku oszacowania aktywności enzymatycznej przyłączonego ALP wykorzystuje się metodę kolorymetryczną z użyciem p-nitrofenylofosforanu

¹⁸ J. Iqbal, *An enzyme immobilized micorassay in capillary electrophoresis for characterization and inhibition studies of alkaline phosphatases*, „Department of Pharmaceutical Sciences, Analytical Biochemistry” 2011, nr 414, s. 226–231.

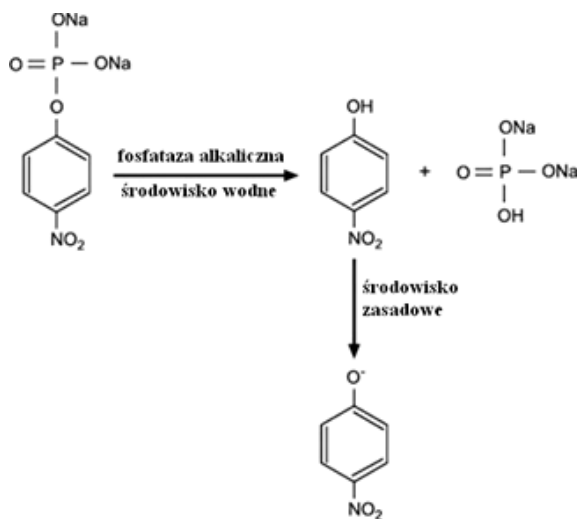
¹⁹ F. Cho-Ngwa, E. N. Mbua, K. G. Nchamukong, V. P. K. Titanji, *Detection, purification and characterisation of a secretory alkaline phosphatase from Onchocerca species*, „Biotechnology Unit, Department of Biochemistry and Microbiology, Molecular and Biochemical Parasitology” 2007, s. 136–143.

²⁰ J. Iqbal, op. cit., s. 226–231; H. Orimo, *The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in heath and disease*, „Division of Medical and Biological Chemistry, Graduate School of Medicine, Journal of Nippon Medical School” 2010, s. 4–12; T. Osathanon, C. M. Giachelli, M. J. Somerman, *Immobilization of alkaline phosphatase on microporous nanofibrous fibrin scaffolds for bone engineering*, „Biomaterials” 2009, s. 4513–4521.

²¹ T. Osathanon, C. M. Giachelli, M. J. Somerman, op. cit., s. 4513–4521.

(p-NPP). W reakcji hydrolizy generowany jest p-nitrofenol (p-NP), który w środowisku zasadowym ulega deprotonacji z wytworzeniem p-nitrofenolanu. Jon ten cechuje się intensywnym pasmem absorpcji z maksimum przy 405 nm, co koresponduje z intensywnym żółtym zabarwieniem oznaczanych próbek ALP. Wzrost intensywności jest ściśle związany z wartością aktywności fosfatazy alkalicznej w badanych układach (Ryc. 6)²².

Rys.6. Schemat reakcji oznaczania ALP



Zmodyfikowany na podstawie: <http://www.gbiosciences.com/PhosphataseAssay-desc.aspx>

STABILNOŚĆ UKŁADÓW LAYERSOME ZAWIERAJĄCYCH BIAŁKO KOTWICZĄCE PRZESZ GPI

Z punktu widzenia zastosowania liposomów jako nośników w kontrolowanym uwalnianiu substancji biologicznie czynnych oprócz efektywności zamykania leku w nośniku niezwykle istotna jest także zdolność do utrzymania go wewnątrz pęcherzyka bądź na jego powierzchni (w przypadku białek wiążących się z dwuwarstwą lipidową przez GPI). To, jak szybko substancja biologicznie czynna jest uwalniana do środowiska zewnętrznego, zależy od przepuszczalności dwuwarstwy lipidowej oraz stabilności układu. Tę ostatnią mierzy się w obecności czynnika powodującego lizę błony komórkowej. Jest nim niejonowy surfaktant Triton X-100 stosowany w biologii do izolacji białek błonowych.

²² J. Iqbal, op. cit., s. 226–231.

Ze względu na obojętny charakter chemiczny tego detergentu izolowane proteiny zachowują swój stan natywny²³. Po każdorazowym dodatku czynnika destabilizującego wykonuje się pomiary spektrofotometryczne gęstości optycznej układu²⁴. W tym celu mierzy się absorbancję próbki przy dwóch długościach fali. Pierwsza z nich (320 nm) odpowiada tzw. ogonowaniu widma liposomów związanemu z rozpraszaniem. Druga wartość absorbancji przypada natomiast na bliską podczerwień (800 nm) i stanowi swoiste tło. W trakcie eksperymentu należy uwzględnić całkowitą objętość próbki odpowiadającą danemu etapowi miareczkowania. Wiadomo, że liposomy jako cząstki nanometrycznych rozmiarów są zdolne do rozpraszania wiązki światła. Jeśli na taki układ zadziała się czynnikiem dezintegrującym dwuwarstwę lipidową, dochodzi do rozpadu liposomów, a co za tym idzie do spadku intensywności rozpraszania światła przechodzącego przez próbkę. Sumaryczna gęstość optyczna układu ulega zatem znacznemu obniżeniu. Ze względu na tendencję Tritonu X-100 do tworzenia micel przy odpowiedniej wartości krytycznego stężenia micelizacji (CMC) gęstość optyczna miareczkowanego układu nie osiągnie wartości zerowej. W identyczny sposób mierzy się także stabilność układów *layersome*: liposom (zawierający przyłączone białko)-polimer.

WYNIKI

Wykonano pomiary stabilności układów *layersome* zawierających białko ALP. W tym celu przygotowano próbki liposomów o składzie PC:CHOL 9:1 (stosunek objętościowy) zawierających przyłączoną fosfatazę alkaliczną. Liposomy otrzymywano metodą hydratacji suchego filmu lipidowego roztworem białka, a następnie sonikowano próbkę przez 10 min. Podczas sonikacji próbka była chłodzona w łaźni lodowej. Nieprzyłączone do liposomów białko odwirowano przy użyciu koncentratorów wirówkowych VIVASPIN 2 zawierających membranę o wielkości porów 100,000 MWCO. Kolejnym krokiem było dodawanie zoptymalizowanej objętości roztworu polimeru (pochodnych poli(alkoholu winylowego)) o stężeniu 1 mg/ml. Próbkę liposomów z polimerem inkubowano 12 godzin. Efektywność pokrywania liposomów polimerami skontrolowano przy użyciu techniki dynamicznego rozpraszania światła (DLS). Zmierzono wartości potencjałów zeta układów *layersome*, jak również wielkości nanocząstek. Dane te zestawiono poniżej (Tab. 1, Ryc. 7).

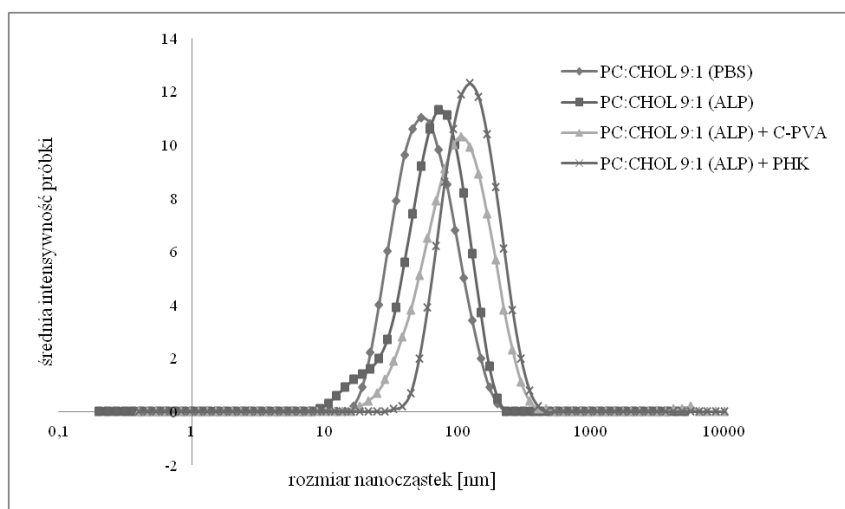
²³ M. Bolean, A. M. S. Simão, B. Z. Favarin, J. L. Millán, P. Ciancaglini, *Thermodynamic properties and characterization of proteoliposomes rich in microdomains carrying alkaline phosphatase*, „Biophysical Chemistry” 2011, nr 158, s. 111–118.

²⁴ O. M. Atrooz, *Effects of Alkylresorcinolic Lipids Obtained from Acetonic Extract of Jordanian Wheat Grains on Liposome Properties*, „International Journal of Biological Chemistry” 2011, nr 5, s. 314–321; Y. Fukui, K. Fujimoto, *The Preparation of Sugar Polymer-Coated Nanocapsules by the Layer-by-Layer Deposition on the Liposome*, „Langmuir” 2009, nr 17, s. 10020–10025.

Tab. 1. Zmiany wartości potencjału zeta układów *layersome*

Nazwa układu	Potencjał zeta [mV]
PC:CHOL 9:1 (PBS)	-18,4
PC:CHOL 9:1 (ALP)	-34,7
PC:CHOL 9:1 (ALP) + C-PVA	-23,2
PC:CHOL 9:1 (ALP) + PHK	-30,5

Źródło: Opracowanie własne

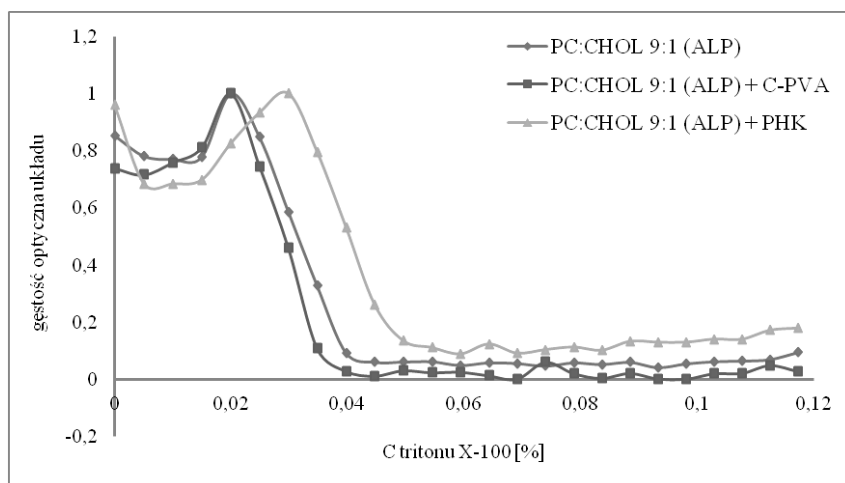
Ryc. 7. Rozkład rozmiarów układów *layersome* oraz liposomów niepokrytych polimerami

Źródło: Opracowanie własne

Otrzymane układy liposomalne zróżnicowane są pod względem zarówno rozmiarów, jak i potencjałów zeta. Największe nanocząstki otrzymano w przypadku liposomów pokrywanych polimerem amfifilowym (122,4 nm). Także wartość potencjału zeta układów *layersome* wskazuje, że pokrywanie polimerem hydrofobowo-kationowym zapewnia otrzymanie stabilniejszych układów w porównaniu do systemów zawierających C-PVA.

Układy *layersome* zawierające ALP miareczkowano niejonowym surfaktantem Tritonem X-100 o stężeniu 5%. Po każdorazowym dodatku titranta próbka była starannie mieszana, a następnie wykonywano pomiary absorpcji w zakresie 190–800 nm. Odczytywano wartość absorbancji dla dwóch długości fali: 320 nm oraz 800 nm. Dane te posłużyły do wyznaczenia wartości gęstości optycznej układu (Ryc. 8).

Ryc.8. Zmiany wartości gęstości optycznej układów *layersome* zawierających fosfatazę alkaliczną



Źródło: Opracowanie własne

Na powyższym wykresie widać wyraźnie, że układ *layersome* zawierający polimer amfifilowy cechuje znaczny wzrost stabilności. Jest to związane z obecnością długich łańcuchów alkilowych wnikaających w strukturę dwuwarstwy lipidowej. Dzięki nim polimer hydrofobowo-kationowy (PHK) może swobodnie inkorporować w dwuwarstwę liposomu.

Wykonano także pomiary wartości aktywności enzymatycznej przyłączonego białka ALP w układach liposom-polimer. Wyniki zestawiono poniżej w tabeli.

Tabela 2. Zmiany wartości aktywności enzymatycznej białka ALP w wybranych układach *layersome*

Nazwa układu	Wartość aktywności ALP [U/L]
PC:CHOL 9:1 (ALP)	8,63
PC:CHOL 9:1 (ALP) + C-PVA	6,75
PC:CHOL 9:1 (ALP) + PHK	11,67
Wodny roztwór białka ALP (odnośnik)	12,38

Źródło: Opracowanie własne

Pokrywanie powierzchni liposomów polielektrolitem (C-PVA) nieposiadającym ugrupowań kotwiczących w dwuwarstwie lipidowej (jak długie łańcuchy węglowodorowe) powoduje zazwyczaj znaczną utratę aktywności przyłączonego białka. Jest to wyniki intensywnych oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy układami *layersome* (w szczególności przyłączoną do powierzchni fosfatazą alkaliczną) a polimerem kationowym. Sytuacja wygląda korzystniej podczas zastosowania polimerów amfifilowych (jak np. PHK), gdzie oddziaływanie elektrostatyczne jest ograniczone poprzez wnikanie łańcuchów węglowodorowych polimeru w strukturę dwuwarstwy pęcherzyka liposomalnego.

PODSUMOWANIE

Wraz z odkryciem u organizmów eukariotycznych obecności białek kotwiczących poprzez ugrupowanie GPI w dwuwarstwie lipidowej technologia liposomalna zaczęła poszerzać wachlarz swoich zastosowań. Początkowo wierzone, że białka te są przyłączone kowalencyjnie do powierzchni błony komórkowej. W późniejszych latach określono strukturę kotwicy glikozylofosfatydylinozytolowej (GPI). Od tego momentu nastąpił rozwój procedur umożliwiających kontrolowane dostarczanie białek błonowych kotwiczących w liposomach poprzez GPI. Problem, z jakim trzeba się jednak zmierzyć, to ograniczona stabilność układów liposom-białko. Aby zwiększyć odporność nośnika i substancji biologicznie aktywnej na zmiany środowiska reakcyjnego, takie jak np. temperatura, pH czy obecność innych substancji w roztworze, można pokrywać liposomy zawierające białko przy użyciu naturalnych lub syntetycznych polielektrolitów. Należy przy tym zwrócić uwagę, że nie zawsze wzrost stabilności układu jest skorelowany ze wzrostem bądź stabilizacją aktywności enzymatycznej przyłączonego białka. Pomiaru stabilności można wykonywać za pomocą wielu dostępnych technik. Jedną z najwygodniejszych jest pomiar zmian gęstości optycznej układu w trakcie miareczkowania niejonowym surfaktantem destabilizującym dwuwarstwę lipidową i uwalniającym przyłączone białko.

ABSTRACT

This paper presents the development of novel liposomal nanocarriers which can be used in delivery of biologically-active substances, such as proteins. There is a great interest in liposomal carriers, which could be used for medical and pharmacological applications. However, because of low stability of liposomes, such applications are challenging. Certain external factors, such as pH, temperature or the presence of other substances in the environment may have a damaging effect on the lipid vesicles.

Proteins are known to play an essential role in the functioning of living organisms. They have mechanical-structural functions, but they can also act as biocatalysts (enzymes), neurotransmitters, or are involved in the transport of small molecules and ions in tissue. The interest in GPI-linked proteins is related to their ability to incorporate in the lipid bilayer. They have a

glycosylphosphatidylinositol anchor with two long alkyl chains. These chains can incorporate in the cell membrane, thus allowing their attachment to the outer surface of vesicles.

Coating them with polyelectrolytes can increase the stability of liposomes. It was found that some polymeric films have the ability to stabilize the liposomal nanocarriers of proteins. That can be correlated with the value of the zeta potential of polymer which coats liposomes, as well as with the shape of a polymeric chain. The polymeric coating can be carefully chosen to ensure that the stabilizing effect will be associated with protein protection reflected in its high enzymatic activity.

WYKAZ SKRÓTÓW

ALP	fosfataza alkaliczna – białkowy enzym hydrolityczny
APC	(ang. <i>antigen presenting cell</i>) komórka prezentująca antygen
BSA	albumina surowicy bydlęcej
C-PVA	kationowa pochodna poli(alkoholu winylowego) [PVA] powstała przez modyfikację PVA za pomocą chlorku glicydylotrimetyloamoniowego [GTMAC]
GPI	ugrupowanie glikozylofosfatydyloinozytolowe
MTX	metotrexat
PEG	glikol polietylenowy
PHK	hydrofobowo-kationowa pochodna poli(alkoholu winylowego) [PVA] powstała przez modyfikację PVA za pomocą 1-bromoheksadekanu oraz chlorku glicydylotrimetyloamoniowego [GTMAC]
p-NPP	p-nitrofenylofosforan
p-NP	p-nitrofenol

BIBLIOGRAFIA

1. Angelini G., Boncompagni S., De Maria P., Fontana A., Gasbarri C., Siani G., *Kinetic evolution of the effect of layer by layer deposition of polyelectrolytes on the stability of POPC liposomes*, „Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects” 2008, nr 322, s. 234–238.
2. Atrooz O. M., *Effects of Alkylresorcinolic Lipids Obtained from Acetonic Extract of Jordanian Wheat Grains on Liposome Properties*, „International Journal of Biological Chemistry” 2011, nr 5, s. 314–321.
3. Bendas G., Krause A., Bakowsky U., Vogel J., Rothe U., *Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique*, „International Journal of Pharmaceutics” 1999, nr 181, s. 79–93.
4. Bolean M., Simão A. M. S., Favarin B. Z., Millán J. L., Ciancaglini P., *Thermodynamic properties and characterization of proteoliposomes rich in microdomains carrying alkaline phosphatase*, „Biophysical Chemistry” 2011, nr 158, s. 111–118.
5. Cho-Ngwa F., Mbua E. N., Nchamukong K. G., Titanji V. P. K., *Detection, purification and characterisation of a secretory alkaline phosphatase from Onchocerca species*, „Biotechnology Unit, Department of Biochemistry and Microbiology, Molecular and Biochemical Parasitology” 2007, s. 136–143.
6. Ciobanu M., Heurtault B., Ruhlmann C., Muller C. D., Frisch B., *Layersome: Development and optimization of stable liposomes as drug delivery system*, „International Journal of Pharmaceutics” 2007, nr 344, s. 154–157.

7. Decher G., Schlenoff J. B., *Multilayer thin films*, Wiley-VCH 2003.
8. Eisenhaber B., Maurer-Stroh S., Novatchkova M., Schneider G., Eisenhaber F., *Enzymes and auxiliary factors for GPI lipid anchor biosynthesis and post-translational transfer to proteins*, „BioEssays” 2003, nr 25, s. 367–385.
9. Feng C., Zhang C., Shao X., Liu Q., Qian Y., Feng L., Chen J., Zha Y., Zhang Q., Jiang X., *Enhancement of nose-to-brain delivery of basic fibroblast growth factor for improving rat memory impairments induced by co-injection of β -amyloid and ibotenic acid into the bilateral hippocampus*, „International Journal of Pharmaceutics” 2012, nr 423, s. 226–234.
10. Feng S.-S., Ruan G., Li Q.-T., *Fabrication and characterizations of a novel drug delivery device liposomes-in-microsphere (LIM)*, „Biomaterials” 2004, nr 25, s. 5181–5189.
11. Ferguson M. A. *The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research*, „Journal of Cell Science” 1999, nr 112, s. 2799–2809.
12. Ferguson M. A., Homans S. W., Dwek R. A., Rademacher T. W., *Glycosyl-phosphatidylinositol moiety that anchors Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein to the membrane*, „Science” 1988, nr 239, s. 753–759.
13. Ferguson M. A., Low M. G., Cross G. A., *Glycosylsn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein*, „The Journal of Biological Chemistry” 1985, nr 260, s. 14547–14555.
14. Fukui Y., Fujimoto K., *The Preparation of Sugar Polymer-Coated Nanocapsules by the Layer-by-Layer Deposition on the Liposome*, „Langmuir” 2009, nr 17, s. 10020–10025.
15. *GPI-anchored biomolecules*, in *GPI anchored membrane proteins and carbohydrates*, eds. D. C. Hoessli, S. Ilangumaran, 1999, s. 1–14.
16. Helenius A., Simons K., *Solubilization of membranes by detergents*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1975, nr 415 (1), s. 29–79.
17. Homans S. W., Ferguson M. A., Dwek R. A., Rademacher T. W., Anand R., Williams A. F., *Complete structure of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of rat brain Thy-1 glycoprotein*, „Nature” 1988, nr 333, s. 269–272.
18. Immordino M. L., Dosio F., Cattel L., *Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential*, „International Journal of Nanomedicine” 2006, s. 297–315.
19. Iqbal J., *An enzyme immobilized micorassay in capillary electrophoresis for characterization and inhibition studies of alkaline phosphatases*, „Department of Pharmaceutical Sciences, Analytical Biochemistry” 2011, nr 414, s. 226–231.
20. Kopczyński P., *Możliwości zastosowania wybranych markerów obrotu kosztowego w stomatologii*, „Nowiny Lekarskie” 2004, nr 73, s. 318–320.
21. Lasic D., Ceh B., *Stealth Liposomes: From Theory To Product*, „Advanced Drug Delivery Reviews” 1994, nr 24s. 165–177.
22. Machluf M., Regev O., Peled Y., Kost J., Cohen S., *Characterization of microencapsulated liposome system for the controlled delivery of liposome-associated macromolecules*, „Journal of Controlled Release” 1996, nr 43, s. 35–45.
23. Marquez L., Mauad de Abreu F. A., Ferreira C., Alves G., Miziara M., Alves J., *Enhanced bone healing of rat tooth sockets after administration of epidermal growth factor (EGF) carried by liposome*, „Injury” 2012, w druku.
24. Murray E. W., Robbins S. M., *Antibody Cross-linking of the Glycosylphosphatidylinositol-linked Protein CD59 on Hematopoietic Cells Induces Signaling Pathways Resembling Activation by Complement*, „The Journal of Biological Chemistry” 1998, nr 273 s. 25279–25284.

25. Nakanishi T., Hayashi A., Kunisawa J., Tsutsumi Y., Tanaka K., Yashiro Ohtani Y., Nakanishi M., Fujiwara H., Hamaoka T., Mayumi T., *Fusogenic liposomes efficiently deliver exogenous antigen through the cytoplasm into the MHC class I processing pathway*, „European Journal of Immunology” 2000, nr 30, s. 1740–1747.
26. Nishioka T., Tomatsu S., Gutierrez M. A., Miyamoto K. I., Trandafirescu G. G., Lopez P. L. C. et al., *Enhancement of drug delivery to bone: characterization of human tissue-nonspecific alkaline phosphatase tagged with an acidic oligopeptide*, „Molecular Genetics and Metabolism” 2006, nr 88, s. 244–255.
27. Nosjean, O., Briolay A., Roux, B., *Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions*, „Biochimica et Biophysica Acta” 1997, nr 1331, s. 153–186.
28. Orimo H., *The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in health and disease*, „Division of Medical and Biological Chemistry, Graduate School of Medicine, Journal of Nippon Medical School” 2010, s. 4–12.
29. Osathanon T., Giachelli C. M., Somerman M. J., *Immobilization of alkaline phosphatase on microporous nanofibrous fibrin scaffolds for bone engineering*, „Biomaterials” 2009, s. 4513–4521.
30. Petty H., *Characterization of Cellular Proteins*, „Current Protocols in Cell Biology” 1998, s. 5.1.1–5.1.10.
31. Poelstra K., Bakker W. W., Klok P. A., Hardonk M. J., Meijer D. K., *A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification*, „Laboratory Investigation” 1997, nr 76, s. 319–327.
32. Ronzon F., Morandat S., Roux B., Bortolato M., *Insertion of a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Enzyme into Liposomes*, „The Journal of Membrane Biology” 2004, nr 197, s. 169–177.
33. Soojee S., Culver L., Li Y., Douglas E. P., Gower L. B., *Biomimetic mineralization of collagen via an enzyme-aided PILP process*, „Journal of Crystal Growth” 2010, nr 312, s. 1249–1256.
34. Stebelska K., Wyrozumska P., Grzybek M., Sikorski A. F., *Characterization and medical applications of liposome constructions*, „Advances in Clinical and Experimental Medicine” 2002, nr 11 (2), s. 229–242.
35. Suzuki K., Okumura Y., *GPI-Linked Proteins Do Not Transfer Spontaneously from Erythrocytes to Liposomes. New Aspects of Reorganization of the Cell Membrane*, „Biochemistry” 2000, nr 39, s. 9477–9485.
36. Takeuchi H., Yamamoto H., Toyoda T., Toyobuku H., Hino T., Kawashima Y., *Physical stability of size controlled small unilamellar liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol*, „International Journal of Pharmaceutics” 1998, nr 164, s. 103–111.
37. Tiede A., Bastisch I., Schubert J., Orlean P., Schmidt R. E., *Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes*, „The Journal of Biological Chemistry” 1999, nr 380, s. 503–523.
38. Xiang Q., Xiao J., Zhang H., Zhang X., Lu M., Zhang H., Su Z., Zhao W., Lin C., Huang Y., Li X., *Preparation and characterisation of bFGF-encapsulated liposomes and evaluation of wound-healing activities in the rat*, „Burns” 2011, nr 37, s. 886–895.
39. Xiaomei M., Zhensheng Z., *Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)-stabilized liposomes*, „International Journal of Pharmaceutics” 2006, nr 318, s. 55–61.
40. Zimecki M., Artym J., *Effect of methotrexate on the immune response in selected experimental models*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 2004, nr 58, s. 226–235.

KATARZYNA SZEWCZYK, WALENTYNA BALWIERZ

(UNIwersytet Jagielloński)

METODY DETEKCJI PRZERZUTÓW KOMÓREK NEUROBLASTOMA DO SZPIKU KOSTNEGO

Neuroblastoma (NB) to jeden z najczęstszych nowotworów wieku dziecięcego (7–10%) i jednocześnie najczęstszy pozaczaszkowy guz lity tego wieku¹. Komórki nowotworowe tworzące tkankę guza wywodzą się z embrionalnych komórek nerwowych. Zmiany patologiczne powstają w tkankach współczulnego układu nerwowego, najczęściej w rdzeniu nadnerczy lub przykręgosłupowych zwojach nerwowych. Obraz kliniczny choroby jest bardzo zróżnicowany, od zlokalizowanej masy guza pierwotnego do postaci choroby z obecnością wielonarządowych przerzutów.

Obecnie stosowane programy terapeutyczne u dzieci z NB są bardzo zróżnicowane. Wybór protokołu leczenia opiera się na uwzględnieniu kilku zasadniczych czynników rokowniczych. Niekorzystne znaczenie prognostyczne mają: wiek pacjenta powyżej 1. roku życia w momencie diagnozy, 4. stopień zaawansowania choroby z obecnością przerzutów, budowa histopatologiczna guza bez cech różnicowania oraz niekorzystne aberracje chromosomowe obecne w komórkach NB². Pacjent posiadający wymienione powyżej cechy kwalifikowany

¹ W. Balwierz, *Nerwiak zarodkowy współczulny*, [w:] *Onkologia i hematologia dziecięca*, red. A. Chybicka, K. Sawicz-Birkowska, PZWŁ, Warszawa 2008, s. 357–374; G. M. Brodeur, *Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma*, „Nature Reviews Cancer” 2003, nr 3, s. 203–216; E. Johnson, S. M. Dean et al., *Antibody-based immunotherapy in high-risk neuroblastoma*, „Expert Reviews in Molecular Medicine” 2007, nr 9, s. 1–21; J. M. Maris, M. D. Hogarty et al., *Neuroblastoma*, „Lancet” 2007, nr 369, s. 2106–2120.

² N. Bown, *Neuroblastoma tumor genetics: clinical and biological aspects*, „Journal of Clinical Pathology” 2001, nr 54, s. 897–910; T.A. Ishola, D.H. Chung, *Neuroblastoma*, „Surgical Oncology” 2007, nr 16, s. 149–156; J. M. Maris, *Recent advances in neuroblastoma*, „New England Journal of Medicine” 2010, nr 362, s. 2202–2211.

jest do grupy wysokiego ryzyka niepowodzenia leczenia, stanowiącej około 50% wszystkich przypadków³. Wyniki leczenia w tej grupie dzieci z NB pozostają nadal niezadowolające. Pomimo zwiększenia intensywności terapii 5-letnie EFS (ang. *event free survival*) pozostaje na poziomie 40%⁴. Jedną z przyczyn niepowodzenia leczenia może być obecność przetrwałych po chemioterapii, opornych na dostępne cytostatyki, nowotworowych komórek macierzystych, które mogą zagnieżdżać się zwłaszcza w jamach szpikowych⁵. Dlatego istotnym elementem diagnostyki w NB jest badanie szpiku kostnego w celu potwierdzenia lub wykluczenia obecności komórek nowotworowych zarówno w trakcie diagnozy, jak i podczas prowadzonego leczenia. Dzięki istniejącym technikom laboratoryjnym możliwa jest detekcja nawet pojedynczych komórek NB i monitorowanie tzw. minimalnej choroby resztkowej (ang. *minimal residual disease*, MRD).

MIKROSKOPIA ŚWIETLNA

Jest to technika bazująca na ocenie cytomorfologicznej rozmazów szpiku kostnego, barwionych odczynnikiem Wrighta-Giemsy, w poszukiwaniu komórek nowotworowych. Komórki NBL są nieznacznie lub zdecydowanie większe od erytrocytów. Ich charakterystyczną cechą morfologiczną jest okrągły kształt i bardzo duże jądro komórkowe przy znikomej ilości cytoplazmy. Nie są to jednak na tyle specyficzne własności, aby rozpoznać komórki nowotworowe, zwłaszcza pojedyncze, pomiędzy różnymi komórkami hematopoetycznymi. Detekcja komórek NB w szpiku kostnym jest dodatkowo utrudniona przez ich nierównomierny rozkład i tendencję do tworzenia skupisk zwanych pseudorozełtkami⁶.

Podsumowując, klasyczna ocena cytomorfologiczna szpiku kostnego stosowana do wykrywania komórek NB, pomimo pełnej akceptacji INSS (ang. *International Neuroblastoma Staging System*), jest metodą o niskiej czułości. Pozwala na postawienie pozytywnego wyniku dopiero wtedy, gdy komórki guza stanowią ponad 0,1%, a w niektórych przypadkach nawet 10% komórek szpiku⁷.

³ W. Balwierz, op. cit., s. 357–374; J. M. Maris, M. D. Hogarty et al., *Neuroblastoma*, op. cit., s. 2106–2120; J. M. Maris, *Recent advances in neuroblastoma*, op. cit., s. 2202–2211.

⁴ J. Hara, *Development of treatment strategies for advanced neuroblastoma*, „International Journal of Clinical Oncology” 2012, nr 17, s. 196–203.

⁵ J. M. Maris, *Recent advances in neuroblastoma*, op. cit., s. 2202–2211; T. Kuroda, *Cellular kinetics of neuroblastoma and the role of surgery*, „Pediatric Surgery International” 2011, nr 27, s. 913–917; S. Ootsuka, S. Asami et al., *Useful markers for detecting minimal residual disease in cases of neuroblastoma*, „Biological and Pharmaceutical Bulletin” 2008, nr 31, s. 1071–1074.

⁶ A. Rajwanshi, R. Srinivas et al., *Malignant small round cell tumors*, „Journal of Cytology” 2009, nr 26, s. 1–10.

⁷ P. F. Ambros, G. Mehes et al., *Disseminated tumor cells in the bone marrow – Chances and consequences of microscopical detection methods*, „Cancer Letters” 2003, nr 197, s. 29–34.

IMMUNOCYTOCHEMIA ENZYMATYCZNA I FLUORESCENCYJNA (ANG. IMMUNOCYTOCHEMISTRY)

W metodzie immunocytochemicznej detekcja badanych komórek odbywa się dzięki specyficznemu wiązaniu przeciwciała z antygenem. Do wizualizacji utworzonego kompleksu wykorzystywany jest barwnik fluorescencyjny związany bezpośrednio z przeciwciałem lub enzym i chromogen. Zaletą barwienia fluorescencyjnego jest możliwość jednoczesnego oznaczenia kilku antygenów w komórce, natomiast wadą szybki rozkład fluorochromu pod wpływem światła. Bardziej trwały obraz uzyskuje się dzięki zastosowaniu chromogenu, jednak wówczas liczba testowanych antygenów ogranicza się do dwóch, które ponadto muszą być zlokalizowane w różnych miejscach w komórce. Dodatkowym atutem enzymatycznego znakowania przeciwciała jest wgląd w morfologię komórki. Jest to ważny aspekt weryfikacji komórek NB, zwłaszcza przy niespecyficznym barwieniu immunocytochemicznym, któremu podlegają najczęściej makrofagi⁸.

Antygenem wykorzystywanym do diagnostyki komórek NB w szpiku kostnym jest disialogangliozyd GD2. Jest to antygen prezentowany w komórkach pochodzenia neuroektodermalnego, występujący jedynie na powierzchni błony komórkowej neuronów i obwodowych włókien nerwowych⁹. Rekomendowanym enzymem jest fosfataza alkaliczna, która nie ulega ekspresji w komórkach szpiku kostnego.

Technika immunocytochemiczna jest obecnie jedną z najczulszych metod detekcji komórek NB (10^{-5} do 10^{-6})¹⁰. Wymaga jednak dużego doświadczenia osoby dokonującej oznaczenia, ponieważ ocena preparatu pod mikroskopem jest subiektywna.

CYTOMETRIA PRZEPŁYWOWA (ANG. FLOW CYTOMETRY)

Cytometria przepływowa jest szybką i w pełni zautomatyzowaną metodą diagnostyczną. Wykorzystując wiązkę światła lasera, można dokonać oceny wielkości i ziarnistości komórek, a także obecności antygeny, prezentowanego zarówno na powierzchni komórki, jak i w cytoplazmie oraz jądrze komórkowym.

⁸ Ibidem; K. Beiske, S. A. Burchill et al., *Consensus criteria for sensitive detection of minimal neuroblastoma cells in bone marrow, blood and stem cell preparations by immunocytology and QRT-PCR: Recommendations by the International Neuroblastoma Risk Group Task Force*, „British Journal of Cancer” 2009, nr 100, s. 1627–1637.

⁹ N. Bown, op. cit., s. 897–910; D. Czaplicki, I. Horwacik et al., *New method for quantitative analysis of GD2 ganglioside in plasma of neuroblastoma patients*, „Acta Biochimica Polonica” 2009, nr 56, s. 423–431.

¹⁰ K. Beiske, S. A. Burchill et al., *Consensus criteria for sensitive detection...*, op. cit., s. 1627–1637.

Każdej analizie jakościowej, odbywającej się na podstawie wymienionych wyżej kryteriów, towarzyszy analiza ilościowa utworzonych subpopulacji komórek. Najnowsze cytometry (8-, 12-, a nawet 17-kolorowe) umożliwiają jednoczasową detekcję kilku antygenów znakowanych różnymi fluorochromami¹¹.

Komórki NB charakteryzują się intensywną produkcją białka N-CAM (ang. *neural cell adhesion molecule*), tj. glikoproteiny odpowiedzialnej za adhezję komórek nerwowych i rozpoznawanej przez przeciwciała CD56. Dodatkowo brak im jakiegokolwiek antygeny specyficznego dla leukocytów, dla których komplementarne przeciwciała to CD45. Stąd też ujawnienie mikroprzerzutów tych komórek nowotworowych do szpiku kostnego odbywa się najczęściej w oparciu o immunofenotyp CD45-/CD56+ oraz dodatkowo GD2+/CD9+/CD57+/CD81+¹². CD9 i CD81 są to białka transbłonowe należące do rodziny tetraspanin, biorące udział w adhezji oraz migracji komórek¹³. CD57 to fragment białka rozpoznawany bezpośrednio przez przeciwciała, zwany epitopem. Jest on produkowany w wielu komórkach nerwowych, a jego tkankowo-specyficzna ekspresja zmienia się w trakcie rozwoju układu nerwowego¹⁴.

Warto zauważyć, że profil CD45-/CD56+ nie jest specyficzny tylko dla komórek NB. Używa się go również podczas oznaczania komórek mięsaka Ewinga, rhabdomyosarcoma (mięśniakomięsaka prążkowanokomórkowego), innych nowotworów drobnokomórkowych, czy guzów neuroendokrynnych oraz nieprawidłowych leukocytów¹⁵. Czulość metody szacuje się na 10^{-4} do 10^{-5} ¹⁶.

¹¹ P. Autissier, C. Soulas et al., *Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans*, „Cytometry Part A” 2010, nr 77, s. 410–419; B. Davidson, H. P. Dong et al., *The diagnostic and research applications of flow cytometry in cytopathology*, „Diagnostic Cytopathology” 2012, nr 40, s. 525–535; R. M. De Tute, *Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies*, „Histopathology” 2011, nr 58, s. 90–105.

¹² D. Batinić, K. Dubravčić, *Flow cytometry in the diagnosis of childhood tumors*, „Paediatrica Croatica, Supplement” 2003, nr 47, s. 45–49; M. F. Okcu, R.-Y. Wang et al., *Flow cytometry and fluorescence in situ hybridization to detect residual neuroblastoma cells in bone marrow*, „Pediatric Blood and Cancer” 2005, nr 45, s. 787–795; K. S. Tsang, C. K. Li et al., *Detection of micrometastasis of neuroblastoma to bone marrow and tumor dissemination to hematopoietic autografts using flow cytometry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, „Cancer” 2003, nr 97, s. 2887–2897.

¹³ A. B. Van Spriel, C. G. Figdor, *The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases*, „Microbes and Infection” 2010, nr 12, s. 106–112; F. Leccia, A. Nardone et al., *Cytometric and biochemical characterization of human breast cancer cells reveals heterogeneous myoepithelial phenotypes*, „Cytometry Part A” 2012, Article in Press; D. Powner, P. M. Kopp et al., *Tetraspanin CD9 in cell migration*, „Biochemical Society Transactions” 2011, nr 39, s. 563–567.

¹⁴ D. Focosi, M. Bestagno et al., *CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency*, „Journal of Leukocyte Biology” 2010, nr 87, s. 107–116.

¹⁵ F. Bozzi, F. Gambirasio et al., *Detecting CD56+/NB84+/CD45- immunophenotype in the bone marrow of patients with metastatic neuroblastoma using flow cytometry*, „Anticancer Research” 2006, nr 26, s. 3281–3287.

RT-PCR (ANG. *REVERSE TRANSCRIPTION-POLYMERASE CHAIN REACTION*) I QRT-PCR (ANG. *REAL-TIME QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION*)

Wspólnym elementem wymienionych technik molekularnych jest sprawdzenie poziomu ekspresji wybranego markera molekularnego, który ulega transkrypcji jedynie w komórkach NB. Im silniejsza ekspresja genu markerowego w badanej próbie, tym więcej komórek nowotworowych w szpiku kostnym pacjenta. Istotnym etapem oznaczenia jest synteza cDNA na matrycy mRNA. Może ona odbywać się z wykorzystaniem starterów specyficznych dla danego fragmentu transkryptu genu, tak jak w przypadku RT-PCR. Otrzymujemy wówczas ściśle zdefiniowany produkt amplifikacji, który następnie podlega analizie jakościowej poprzez rozdział elektroforetyczny. Analiza ilościowa w RT-PCR jest utrudniona, ponieważ jest bardzo subiektywna. Badacz, korzystając z własnego doświadczenia, porównuje intensywność luminescencji prążka z badanej próby do obrazu prążków z krzywej wzorcowej. Krzywa ta powstaje na podstawie serii rozcieńczeń wybranej linii komórkowej NB w krwi obwodowej zdrowej osoby.

Inny schemat działania prezentuje QRT-PCR, gdzie w celu przepisania całego genomowego mRNA na cDNA najpierw używane są startery losowe. Dzięki temu powstały kwas nukleinowy jest bardziej stabilny w kolejnym etapie analizy, w którym staje się matrycą reakcji PCR. Pozostałe substraty QRT-PCR to specyficzne startery oraz komplementarne do analizowanej sekwencji cDNA sondy molekularne znakowane fluorochromem. Umożliwia to monitorowanie przyrostu produktu amplifikacji po każdym cyklu trwającej reakcji PCR. Dzięki temu analiza jest szybka i pozwala wyeliminować etap szacowania ilości produktu dopiero po zakończeniu reakcji. Dodatkowo jest ona w pełni zautomatyzowana.

Markerem molekularnym rekomendowanym do detekcji komórek NB jest mRNA hydroksylazy tyrozynowej (*TH*). Białko to jest pierwszym enzymem na szlaku syntezy katecholamin, których nadmierne wydzielanie jest typowe dla komórek NB¹⁷. Obecnie testowane są również inne potencjalne markery, między innymi należący do rodziny genów homeobox *PHOX2β* (ang. *paired-like homeo-*

¹⁶ K. Beiske, S. A. Burchill et al., *Consensus criteria...*, op. cit., s. 1627–1637.

¹⁷ V. F. Viprey, M. V. Corrias et al., *Standardisation of operating procedures for the detection of minimal disease by QRT-PCR in children with neuroblastoma: Quality assurance on behalf of SIOPEX-R-NET*, „European Journal of Cancer” 2007, nr 43, s. 341–350; V. F. Viprey, M. A. Lastowska et al., *Minimal disease monitoring by QRT-PCR: Guidelines for identification and systematic validation of molecular markers prior to evaluation in prospective clinical trials*, „Journal of Pathology” 2008, nr 216, s. 245–252; V. F. Viprey, S. A. Burchill, *Gene expression profiling for discovery of novel markers of minimal disease*, „Clinical Cancer Research” 2009, nr 15, s. 6742; L. H. J. Lambooy, C. E. M. Gidding et al., *Real-time analysis of tyrosine hydroxylase gene expression: A sensitive and semiquantitative marker for minimal residual disease detection of neuroblastoma*, „Clinical Cancer Research” 2003, nr 9, s. 812–819.

box 2β)¹⁸, L-dopa dekarboksylaza DDC (ang. *dopa decarboxylase*; *aromatic L-amino acid decarboxylase*)¹⁹ i doublekortyna DCX (ang. *doublecortin*)²⁰. Natomiast wyniki badań wykluczają syntazę disialogangliozydu GD2S jako znacznik o zbyt niskiej specyficzności dla komórek NB²¹.

Omawiane techniki PCR podobnie jak oznaczenie immunocytochemiczne charakteryzują się bardzo wysoką czułością, sięgającą 10^{-6} – 10^{-22} .

PODSUMOWANIE

U każdego pacjenta na etapie diagnozy, przed włączeniem leczenia, należy obowiązkowo wykonać badanie szpiku kostnego w poszukiwaniu komórek nowotworowych. Zalecenia te dotyczą również monitorowania MRD w trakcie terapii. Zgodnie z najnowszymi programami badawczymi koordynowanymi przez grupę SIOPEN (ang. International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma) ocena szpiku kostnego powinna być wykonana metodą tradycyjnej analizy cytomorfologicznej oraz równocześnie metodą immunocytochemiczną z przeciwciałami anti-GD2 lub techniką molekularną QRT-PCR z zastosowaniem *TH* jako markera²³. Celem trwających badań jest ustalenie klinicznie istotnej liczby komórek NB w szpiku kostnym. Ponadto prowadzone testy wielu markerów molekularnych być może pozwolą wyłonić najbardziej specyficzny marker dla NB, dzięki któremu uzyskiwane będą bardziej wiarygodne wyniki badań zarówno na etapie diagnozy, jak i monitorowania MRD.

¹⁸ C. Gaultier, H. Trang, et al., *Pediatric disorders with autonomic dysfunction: What role for PHOX2B?*, „Pediatric Research” 2005, nr 58, s. 1–6; J. Stutterheim, A. Gerritsen et al., *Phox2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma*, „Journal of Clinical Oncology” 2008, nr 26, s. 5443–5449.

¹⁹ C. Träger, Å. Vernby et al., *mRNAs of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase but not of GD2 synthase are specific for neuroblastoma minimal disease and predicts outcome for children with high-risk disease when measured at diagnosis*, „International Journal of Cancer” 2008, nr 123, s. 2849–2855; F. Bozzi, R. Luksch et al., *Molecular detection of dopamine decarboxylase expression by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction in bone marrow and peripheral blood: Utility as a tumor marker for neuroblastoma*, „Diagnostic Molecular Pathology” 2004, nr 13, s. 135–143.

²⁰ S. Oltra, F. Martinez et al., *The doublecortin gene, a new molecular marker to detect minimal residual disease in neuroblastoma*, „Diagnostic Molecular Pathology” 2005, nr 14, s. 53–57.

²¹ S. Ootsuka, S. Asami et al., op. cit., s. 1071–1074; C. Träger, Å. Vernby et al., op. cit., s. 2849–2855; S. Modak, N.-K. V. Cheung, *Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastoma*, „Cancer Investigation” 2007, nr 25, s. 67–77; B. Kågedal, *Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: Still a ways to go*, „Clinical Chemistry” 2009, nr 55, s. 1268–1270.

²² K. Beiske, S.A. Burchill et al., *Consensus criteria for sensitive detection...*, op. cit., s. 1627–1637.

²³ Ibidem.

ABSTRACT

Neuroblastoma (NB), which is derived from the embryonic neural cells, is one of the most common childhood cancers (7–10%). Despite an increase in treatment intensity, the curability of patients, especially those in the high risk group, is still unsatisfactory. One of the causes of therapy failure may be the presence of cancer stem cells that survive chemotherapy and are capable of colonizing the bone marrow cavities. A very important element in diagnosis of NB is the examination of bone marrow conducted either to confirm or exclude the presence of metastases. The currently used laboratory methods enable the detection of even a single NB cell and allow the monitoring of the minimal residual disease (MRD).

WYKAZ SKRÓTÓW

EFS	przeżycie wolne od niekorzystnych zdarzeń (ang. <i>event free survival</i>)
GD2	glikolipid disialogangliozyd (ang. <i>disialoganglioside GD2</i>)
GD2S	gen syntaza disialogangliozydu (ang. <i>synthase disialoganglioside GD2</i>)
INSS	Międzynarodowy System Klasyfikacji Stopnia Zaawansowania Neuroblastoma (ang. <i>International Neuroblastoma Staging System</i>)
MRD	minimalna choroba resztkowa (ang. <i>minimal residual disease</i>)
NB	neuroblastoma, zwojak zarodkowy współczulny
QRT-PCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SIOPEN	Międzynarodowe Towarzystwo Onkologii Dziecięcej Grupa Europejska ds. Neuroblastoma (ang. <i>International Society of Paediatric Oncology European Neuroblastoma</i>)
TH	hydroksylaza tyrozynowa (ang. <i>tyrosine hydroxylase</i>)

BIBLIOGRAFIA

1. Balwierz W., *Nerwiak zarodkowy współczulny*, [w:] *Onkologia i hematologia dziecięca*, red. A. Chybicka, K. Sawicz-Birkowska, PZWL, Warszawa 2008, s. 357–374.
2. Brodeur G. M., *Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma*, „Nature Reviews Cancer” 2003, nr 3, s. 203–216.
3. Johnson E., Dean S. M. et al., *Antibody-based immunotherapy in high-risk neuroblastoma*, „Expert Reviews in Molecular Medicine” 2007, nr 9, s. 1–21.
4. Maris J. M., Hogarty M. D. et al., *Neuroblastoma*, „Lancet” 2007, nr 369, s. 2106–2120.
5. Bown N., *Neuroblastoma tumor genetics: clinical and biological aspects*, „Journal of Clinical Pathology” 2001, nr 54, s. 897–910.
6. Ishola T. A., Chung D. H., *Neuroblastoma*, „Surgical Oncology” 2007, nr 16, s. 149–156.
7. Maris J. M., *Recent advances in neuroblastoma*, „New England Journal of Medicine” 2010, nr 362, s. 2202–2211.
8. Hara J., *Development of treatment strategies for advanced neuroblastoma*, „International Journal of Clinical Oncology” 2012, nr 17, s. 196–203.
9. Kuroda T., *Cellular kinetics of neuroblastoma and the role of surgery*, „Pediatric Surgery International” 2011, nr 27, s. 913–917.

10. Ootsuka S., Asami S. et al., *Useful markers for detecting minimal residual disease in cases of neuroblastoma*, „Biological and Pharmaceutical Bulletin” 2008, nr 31, s. 1071–1074.
11. Rajwanshi A., Srinivas R. et al., *Malignant small round cell tumors*, „Journal of Cytology” 2009, nr 26, s. 1–10.
12. Ambros P. F., Mehes G. et al., *Disseminated tumor cells in the bone marrow – Chances and consequences of microscopical detection methods*, „Cancer Letters” 2003, nr 197, s. 29–34.
13. Beiske K., Burchill S. A. et al., *Consensus criteria for sensitive detection of minimal neuroblastoma cells in bone marrow, blood and stem cell preparations by immunocytology and QRT-PCR: Recommendations by the International Neuroblastoma Risk Group Task Force*, „British Journal of Cancer” 2009, nr 100, s. 1627–1637.
14. Czaplicki D., Horwacik I. et al., *New method for quantitative analysis of GD2 ganglioside in plasma of neuroblastoma patients*, „Acta Biochimica Polonica” 2009, nr 56, s. 423–431.
15. Autissier P., Soulas C. et al., *Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans*, „Cytometry Part A” 2010, nr 77, s. 410–419.
16. Davidson B., Dong H. P. et al., *The diagnostic and research applications of flow cytometry in cytopathology*, „Diagnostic Cytopathology” 2012, nr 40, s. 525–535.
17. De Tute R. M., *Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies*, „Histopathology” 2011, nr 58, s. 90–105.
18. Batinic D., Dubravčić K., *Flow cytometry in the diagnosis of childhood tumors*, „Paediatrica Croatica, Supplement” 2003, nr 47, s. 45–49.
19. Okcu M. F., Wang R.-Y. et al., *Flow cytometry and fluorescence in situ hybridization to detect residual neuroblastoma cells in bone marrow*, „Pediatric Blood and Cancer” 2005, nr 45, s. 787–795.
20. Tsang K. S., Li C. K. et al., *Detection of micrometastasis of neuroblastoma to bone marrow and tumor dissemination to hematopoietic autografts using flow cytometry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction*, „Cancer” 2003, nr 97, s. 2887–2897.
21. Van Spriël A. B., Figdor C. G., *The role of tetraspanins in the pathogenesis of infectious diseases*, „Microbes and Infection” 2010, nr 12, s. 106–112.
22. Leccia F., Nardone A. et al., *Cytometric and biochemical characterization of human breast cancer cells reveals heterogeneous myoepithelial phenotypes*, „Cytometry Part A” 2012, Article in Press.
23. Powner D., Kopp P. M. et al., *Tetraspanin CD9 in cell migration*, „Biochemical Society Transactions” 2011, nr 39, s. 563–567.
24. Focosi D., Bestagno M. et al., *CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency*, „Journal of Leukocyte Biology” 2010, nr 87, s. 107–116.
25. Bozzi F., Gambirasio F. et al., *Detecting CD56+/NB84+/CD45- immunophenotype in the bone marrow of patients with metastatic neuroblastoma using flow cytometry*, „Anticancer Research” 2006, nr 26, s. 3281–3287.
26. Viprey V. F., Corrias M. V. et al., *Standardisation of operating procedures for the detection of minimal disease by QRT-PCR in children with neuroblastoma: Quality assurance on behalf of SIOPEX-R-NET*, „European Journal of Cancer” 2007, nr 43, s. 341–350.
27. Viprey V. F., Lastowska M. A. et al., *Minimal disease monitoring by QRT-PCR: Guidelines for identification and systematic validation of molecular markers prior to evaluation in prospective clinical trials*, „Journal of Pathology” 2008, nr 216, s. 245–252.
28. Viprey V. F., Burchill S. A., *Gene expression profiling for discovery of novel markers of minimal disease*, „Clinical Cancer Research” 2009, nr 15, s. 6742.

29. Lambooy L. H. J., Gidding C. E. M. et al., *Real-time analysis of tyrosine hydroxylase gene expression: A sensitive and semiquantitative marker for minimal residual disease detection of neuroblastoma*, „Clinical Cancer Research” 2003, nr 9, s. 812–819.
30. Gaultier C., Trang H., et al., *Pediatric disorders with autonomic dysfunction: What role for PHOX2B?*, „Pediatric Research” 2005, nr 58, s. 1–6.
31. Stutterheim J., Gerritsen A. et al., *Phox2B is a novel and specific marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma*, „Journal of Clinical Oncology” 2008, nr 26, s. 5443–5449.
32. Träger C., Vernby Å. et al., *mRNAs of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase but not of GD2 synthase are specific for neuroblastoma minimal disease and predicts outcome for children with high-risk disease when measured at diagnosis*, „International Journal of Cancer” 2008, nr 123, s. 2849–2855.
33. Bozzi F., Luksch R. et al., *Molecular detection of dopamine decarboxylase expression by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction in bone marrow and peripheral blood: Utility as a tumor marker for neuroblastoma*, „Diagnostic Molecular Pathology” 2004, nr 13, s. 135–143.
34. Oltra S., Martinez F. et al., *The doublecortin gene, a new molecular marker to detect minimal residual disease in neuroblastoma*, „Diagnostic Molecular Pathology” 2005, nr 14, s. 53–57.
35. Modak S., Cheung N.-K. V., *Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastoma*, „Cancer Investigation” 2007, nr 25, s. 67–77.
36. Kågedal B., *Detecting minimal residual disease in neuroblastoma: Still a ways to go*, „Clinical Chemistry” 2009, nr 55, s. 1268–1270.

PRACE INTERDYSZYPLINARNE

ADA PAŁKA

(UNIwersytet Jagielloński)

MATEMATYKA W SZTUCE – ANAMORFOZA

ABSTRAKT

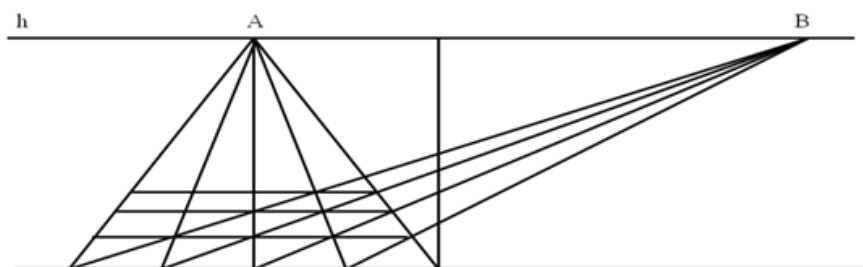
W malarstwie anamorfoza oznacza wynaturzone rzutowanie albo zdeformowane przedstawienie kilku obrazów na płaszczyźnie, które jednak z pewnego punktu obserwacji okazuje się regularne i wykonane według właściwych proporcji. Nasuwają się pytania: Jaka zasada geometryczna opisuje te przekształcenia? Jak je sklasyfikować? Czy owe sztuczki perspektywiczne mają zastosowanie we współczesnym świecie? Na te oraz wiele innych pytań próbuje odpowiedzieć matematyka, ukazując kolejny ścisły związek między nią a sztuką.

RYS HISTORYCZNY

Perspektywa na ogół umożliwia w realistyczny sposób rzutowanie przestrzennych przedmiotów na dwuwymiarową powierzchnię. W celu nadania obrazom normalnej perspektywy artyści rozpoczynali tworzenie swojego dzieła od narysowania linii horyzontu h na wysokości oka (Ryc. 1). Następnie na jej środku zaznaczali punkt główny A , będący punktem zbiegu wszystkich prostych równoległych. W odległości równej oddaleniu oka od punktu centralnego, na linii horyzontu zaznaczano punkt odległości B . Jest to punkt zbiegu przekątnych. Aby prawidłowo odczytać obraz, należy patrzeć na niego z określonego punktu obserwacji. W ten sposób kwadrat podłoża podzielonego szachownicowo po rzutowaniu ukazuje się jako trapezoidalna szachownica, na której wystarczy proporcjonalnie do malejących wymiarów pól umieścić pozostałe przedmioty. Zatem w perspektywie kwadrat staje się trapezem. Przenosząc punkt obserwacji

powyżej punktu głównego, zachowując taką samą odległość od punktu głównego, otrzymujemy odwrotny efekt, trapezy zaczynamy postrzegać jako kwadraty, wracają jakby do swojej pierwotnej formy. Owa osobliwa perspektywa początkowo służyła do sprawdzania poprawności rzutowania perspektywicznego poprzez przeciwieństwo, z czasem jednak dała początek powstawaniu obrazów anamorficznych¹.

Ryc. 1. Konstrukcja perspektywiczna „kwadratu podłoża” podzielonego szachownicowo



h – linia horyzontu, A – punkt główny, B – punkt odległości

Anamorfoza jest więc jakby odchyleniem od normy. Wprawdzie słowo to pojawia się dopiero w XVII wieku, jednak odnosi się do obrazów znanych dużo wcześniej. Podsumowując, anamorfoza (gr. *ana* – z powrotem, *morphe* – forma) jest skrajną konsekwencją perspektywy linearnej, która polega na deformacji obrazu poprzez umieszczenie punktu zbiegu piramidy widzenia z dala od punktu głównego, a punktu obserwacji bardzo blisko płaszczyzny dzieła.

PRZYKŁADY

Najlepszym i jednocześnie najbardziej znanym przykładem obrazującym opisywane deformacje są *Ambasadorowie* Hansa Holbeina (1533). Dzieło to przedstawia francuskich ambasadorów stojących przed regałem. Obraz przepełniony jest symbolicznymi przedmiotami, mającymi między innymi odwołać do *quadrivium* sztuk wyzwolonych: arytmetyki, geometrii, astronomii i muzyki, a także naukowości... Jednak największą uwagę przyciąga dziwna ukośna plama na dole obrazu. Gdy spojrzymy na nią pod odpowiednim kątem, naszym oczom ukazuje się czaszka, która miała symbolizować śmierć. Stanowi ona zatem element anamorficzny obrazu, nadając całemu dziełu ponadczasowe przesłanie.

¹ J. Baltrusaitis, *Anamorfozy*, Gdańsk 2009, s. 48–49.

Innym dziełem wartym uwagi jest praca Emmanuela Maignana (1642) pt. *Św. Franciszek z Paoli*, która znajduje się w Klasztorze Trinità dei Monti (Ryc. 3). Monumentalną kompozycję o długości dwudziestu metrów i wysokości trzech i pół metra możemy podziwiać, idąc korytarzem. Naszym oczom ukazuje się wtedy pejzaż morskiej zatoki. Jednak gdy stanimy na końcu krużganka, z owego pejzażu wyłania się postać Św. Franciszka z Paoli, modlącego się pod drzewem².

W pierwszej połowie XVII wieku pojawiły się obrazy anamorficzne, w których odtworzenie naturalnych proporcji wymagało zastosowania powierzchni lustrzanych.

KLASYFIKACJA I NAZEWNICTWO

Wcześniejsze przykłady możemy zaliczyć do jednej grupy – anamorfoz płaszczyznowych, gdyż odczytanie ich wymaga jedynie przyjęcia odpowiedniego punktu obserwacji.

Wyróżniamy również anamorfozy refleksyjne. Przypisujemy do tej grupy dzieła, których prawidłowa restytucja wymaga nie tylko przyjęcia odpowiedniego punktu obserwacji, ale także odbicia w powierzchni lustrzanej (Ryc. 4)³.

ZASTOSOWANIE

Najbardziej rozpowszechnionymi anamorfozami są anamorfozy płaszczyznowe. Do nich właśnie możemy zaliczyć całą grupę poziomych znaków drogowych. Nieproporcjonalnie rozciągnięte znaki namalowane na ulicy z punktu widzenia użytkownika drogi przybierają naturalne proporcje (Ryc. 5).

Odpowiednie anamorfozy płaskie i refleksyjne są wykorzystywane przy wystroju wnętrz, między innymi w postaci rysunków na ścianach, które w zależności od punktu obserwacji przedstawiają inny wizerunek. Możemy je spotkać w architekturze, gdzie lustrzane kolumny pełnią funkcję nie tylko architektonicznej podpory, ale także dodatkowego elementu wystroju, w którym odbijają się różne figury specjalnie w tym celu wykonane w posadzce. Na rynku pojawiły się również anamorficzne refleksyjne filiżanki, w przypadku których zdeformowany napis czy rysunek znajdujący się na spodku przybiera realistyczne kształty, gdy spojrzymy na jego odbicie w lustrzanym kubeczku.

² Ibidem, s. 60.

³ A. Zdziarski, *Klasyfikacja i nazewnictwo obrazów anamorficznych*, „Biuletyn PTGiG” 2005, nr 15, s. 26–29.

Ostatnio dużą popularnością cieszą się anamorficzne malowidła wykonane na chodnikach czy budynkach, które postrzegane z odpowiedniego punktu w magiczny sposób przedstawiają trójwymiarowy świat. Jest to więc nowy środek wyrazu i przekazu informacji w niestandardowy, utajony sposób, coraz częściej rozpowszechniany też reklamie.

SIATKI DEFORMACYJNE

Moje badania naukowe skupiają się na analitycznym opisie konstruowania siatek deformacyjnych anamorfoz. Siatki deformacyjne umożliwiają nam w prosty sposób stworzenie obrazu anamorficznego. Konstrukcyjny opis ich tworzenia możemy znaleźć w książkach i opracowaniach dotyczących anamorfozy, jednak nie są one spójne. Nieznaczące różnice w przeprowadzonych konstrukcjach generują powstanie nieprzystających siatek deformacyjnych. Analityczny opis pozwoli na zweryfikowanie ich poprawności, a jednocześnie jednoznacznie wyznaczenie wspominanych siatek.

PODSUMOWANIE

Anamorfoza jest więc ciekawym obszarem poszukiwań zarówno dla historyków sztuki, jak i matematyków. Współczesna geometria wykreślna i analityczna pozwala na upowszechnienie anamorfozy, dzięki czemu możemy coraz częściej spotkać się z nią w otaczającym nas świecie.

ABSTRACT

In painting, anamorphosis means a representation of images distorted at the surface, which from a certain point of view turn out to be regular and made according to proper proportions. Questions arise: which geometric rules describe these transformations and how to classify them? Do those perspective tricks have practical use? Descriptive and analytic geometry tries to answer these and many other questions and shows another close connection between mathematics and art.

BIBLIOGRAFIA

1. Baltrusaitis J., *Anamorfozy*, Gdańsk 2009.
2. Bartel K., *Perspektywa malarska*, t. 2, Warszawa 1958.
3. Białostocki J., *Albrecht Durer jako pisarz i teoretyk sztuki*, Wrocław 1965.
4. Kemp M., *The Science of Art: Optical Themes in Western Art from Brunelleschi to Seurat*, Yale 1990.

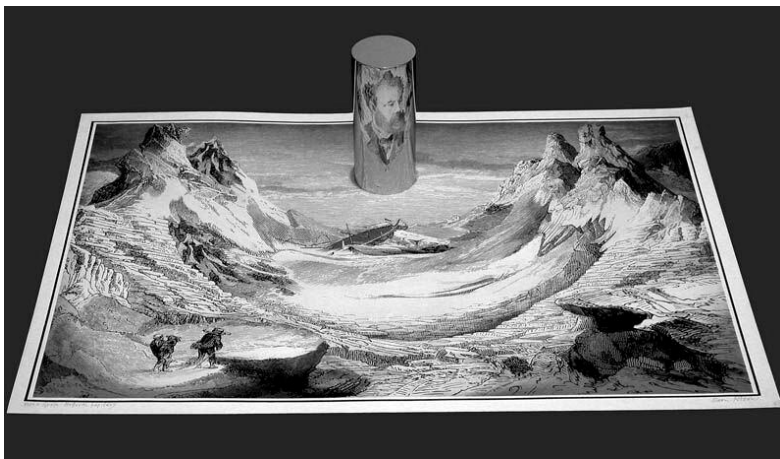
5. Massey L., *Picturing Space, Displacing Bodies, Anamorphosis in Early Modern Theories of Perspective*, Pennsylvania 2007.
6. Niczyporowicz E., *Krzywe płaskie, wybrane zagadnienia z geometrii analitycznej i różniczkowej*, Warszawa 1991.
7. Panofsky E., *Perspektywa jako „forma symboliczna”*, Warszawa 2008.
8. Zdziarski A., *Podstawy powstawania rzutu anamorficzno-refleksyjno-walcowego*, Kielce 1979.
9. Zdziarski A., *Klasyfikacja i nazewnictwo obrazów anamorficznych*, „Biuletyn PTGiGI” 2005, nr 15.
10. Zdziarski A., Pałka A., *Limaçon of Pascal as an Anamorphic Image of a Circle*, „The Journal of Polish Society for Geometry and Engineering Graphics” 2011, vol. 22, s. 3–6.
11. Pałka A., *Mathematics in art – anamorphosis*, [w:] *Modern research trends of Young scientists: current status, problems and prospects*, ed. M. Baranowska-Szczepańska, M. Gołaszewski, Poznań 2012.



Ryc. 2. Hans Holbein, *The Ambassadors*, 1533
Londyn, National Gallery



Ryc. 3. Emmanuel Maignan, *Św. Franciszek z Paoli*, 1642
Rzym, fot. autorka



Ryc. 4. Przykład anamorfozy refleksyjnej walcowej autorstwa Istvána Orosza
www.anamorphosis.com



Rys. 5. Anamorfoza płaszczyznowa
Fot. autorka



Ryc. 6. Anamorficzna filiżanka
Fot. autorka

INFORMACJE O AUTORACH

Krzysztof Nesterowicz – MPharm, PhD candidate. Social Pharmacy Department Faculty of Pharmacy Jagiellonian University Medical College, Medyczna 9 Street, Kraków 30-688, Poland.

Robert Sitarz – doktor nauk medycznych, pracownik naukowy Katedry i Zakładu Anatomii Prawidłowej Człowieka Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, asystent w Klinice Chirurgii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, współpracuje z Zakładem Patologii Uniwersyteckiego Centrum Medycznego w Utrechcie. Zainteresowania naukowe: molekularne podłoże nowotworów układu pokarmowego.

Małgorzata Kolańska-Bzoma – doktorantka w Katedrze i Zakładzie Anatomii Prawidłowej Człowieka Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Zainteresowania naukowe: zapalne podłoże chorób nowotworowych.

Magdalena Skórzewska – doktorantka w Klinice Chirurgii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Zainteresowania naukowe: chemioterapia, radioterapia.

Wojciech P. Polkowski – profesor doktor habilitowany, Klinika Chirurgii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Zainteresowania naukowe: podstawy molekularne leczenia chorób nowotworowych, skojarzone leczenie nowotworów piersi, układu pokarmowego, tarczycy, tkanek miękkich, skóry, w tym czerniaka.

Ryszard Maciejewski – profesor doktor habilitowany, Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej Człowieka Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Zainteresowania naukowe: wpływ odmy otrzewnowej podczas zabiegów laparoskopowych (aspekt molekularny i anatomiczny), biologia molekularna nowotworów układu rozrodczego i przewodu pokarmowego, zatorowość płucna.

Marta B. Kaczor – doktorantka w Katedrze Biochemii Lekarskiej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Magdalena Łukasiewicz – doktorantka na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Zainteresowania naukowe: otrzymywanie nośników liposomalnych i ich zastosowanie w kontrolowanym dostarczaniu substancji biologicznie aktywnych, w tym antyarytmicznych oraz białek GPI-wiążących; stabilizacja

pęcherzyków lipidowych uprzednio modyfikowanymi polimerami; praca nad nośnikami heparyny niskocząsteczkowej.

Katarzyna Szewczyk – doktorantka na Wydziale Lekarskim Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii, Klinika Onkologii i Hematologii Dziecięcej.

Walentyna Balwierz – profesor doktor habilitowana, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Polsko-Amerykański Instytut Pediatrii, Klinika Onkologii i Hematologii Dziecięcej.

Ada Pałka – doktorantka na Wydziale Matematyki i Informatyki Uniwersytetu Jagiellońskiego.