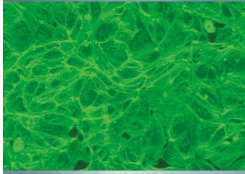


ISSN 1643-9543

**POSTĘPY  
POLSKIEJ MEDYCyny  
I FARMACJI**

Wydawnictwo Naukowe PWN



# Nukleotydy zewnątrzkomórkowe i indukowana przez nie odpowiedź komórek śródbłónka

## Extracellular nucleotides and the endothelial cell responses

Elżbieta Kaczmarek<sup>1</sup>,  
Katarzyna Koziak<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Beth Israel Deaconess Medical Center, Center for Vascular Biology Research, Department of Surgery, Harvard Medical School, MA, U.S.A.

<sup>2</sup> Zakład Biochemii Ogólnej i Żywności, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2002 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem prof. Katarzyny Koziak grant na realizację projektu badawczego pt. *Regulacja procesu migracji komórek śródbłónka naczyń przez receptory P2 purynergiczne.*

### Streszczenie

Od kilku lat coraz więcej uwagi poświęca się roli zewnątrzkomórkowych nukleotydów i aktywowanych przez nie receptorów purynergicznych P2 w regulacji funkcji komórek śródbłónka naczyniowego. Celem projektu finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy było zbadanie roli receptorów purynergicznych P2 w migracji komórek śródbłónka. Wyniki badań zostały opublikowane w 2005 roku w czasopiśmie *Thrombosis and Haemostasis* (93(4): 735–42). Była to pierwsza ilustracja roli, jaką w komórkach śródbłónka pełnią nukleotydy, które aktywując szlaki przekazywania sygnału prowadzą do przebudowy cytoszkieletu, aktywacji integryn, adhezji i nasilenia ruchliwości komórek. Są to odpowiedzi komórkowe warunkujące angiogenezę. Receptorami indukującymi te zjawiska są prawdopodobnie receptory P2Y2 i P2Y4. Uzyskane wyniki umożliwiły uznanie śródbłónkowych receptorów P2Y za nową grupę receptorów uczestniczących w angiogenezie.

**Słowa kluczowe:** komórki śródbłónka • receptory P2Y • nukleotydy zewnątrzkomórkowe • angiogeneza

### Summary

In recent years, there has been a rapidly growing interest in defining the role of extracellular nucleotides and their respective purinergic P2 receptors in the endothelium. The aim of the project funded in part by Polpharma Scientific Foundation was to determine the role of purinergic P2 receptors in endothelial cell angiogenic responses. The results of the study were published in 2005 in *Thrombosis and Haemostasis* (93(4): 735–42). It was shown for the first time that through the activation of P2 receptors, particularly P2Y2 and P2Y4, nucleotides induce cytoskeletal rearrangements, activation of integrins, and adhesion kinases, and increase endothelial cell migration. These responses are characteristics of angiogenic phenotype, therefore we propose that endothelial P2Y receptors represent a new group of receptors that are involved in the regulation of angiogenesis. In this article we present some of our published and unpublished data and discuss them in the context of other reports.

**Key words:** endothelial cells • P2Y receptors • extracellular nucleotides • angiogenesis

Wpłynęło: 06-12-2010  
Zaakceptowano: 08-12-2010  
Opublikowano: 30-03-2011

---

**Adres do korespondencji:**  
dr hab. Katarzyna Koziak,  
Zakład Biochemii Ogólnej  
i Żywności, Wydział Nauki  
o Zdrowiu, Warszawski  
Uniwersytet Medyczny,  
ul. Banacha 1a, 02-097  
Warszawa, e-mail:  
katarzyna.koziak@wum.edu.pl

## WSTĘP

W 1996 roku zespół naukowców z Uniwersytetu Harvarda zidentyfikował CD39, już wcześniej znany marker aktywacji limfocytów, jako związaną z zewnętrzną błoną komórek śródbłonka ATP difosfohydrolazę (ATPDazę, NTPDazę-1<sup>1</sup>), najważniejszy naczyniowy enzym hydrolizujący zewnątrzkomórkowe nukleotydy. Scharakteryzowanie NTPDazy-1 wywołało gwałtowny wzrost zainteresowania rolą, jaką zewnątrzkomórkowe nukleotydy pełnią w regulacji funkcji komórek krwi oraz komórek ściany naczynia krwionośnego, w tym zwłaszcza komórek śródbłonka. Niektóre reakcje naczyniowe na stymulację nukleotydami, np. skurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych po stymulacji ATP [1,2] czy aktywacja i agregacja płytek krwi aktywowanych ADP, były powszechnie znane od lat, natomiast molekularne mechanizmy pozostawały nieznanymi. Do znaczącego postępu w ich zrozumieniu przyczyniło się, oprócz zidentyfikowania NTPDazy-1, także sklonowanie receptorów purynergicznymi P2, scharakteryzowanie związanych z nimi szlaków przekazywania sygnału w różnych typach komórek i tkanek oraz badania na myszach pozbawionych funkcjonalnych genów kodujących receptory P2. Wyniki opublikowanych w ostatnich latach prac pozwalają stwierdzić, że efektem aktywacji komórek śródbłonka przez zewnątrzkomórkowe nukleotydy jest odpowiedź komórkowa podobna do tej, jaką wywołują klasyczne już związki regulujące funkcje tych komórek, np. śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. vascular endothelial growth factor; VEGF) i trombina [3–5].

Zewnątrzkomórkowe ATP i ADP oraz tri- i difosforany innych nukleozydów pojawiają się w osoczu w następstwie uszkodzenia tkanek i śmierci komórek, są także uwalniane do przestrzeni okołokomórkowej w wyniku działania mechanizmów nielitycznych. Do najważniejszych z nich zalicza się egzocytozę ziarnistości zawierających nukleotydy [6], aktywny transport przez błonę komórkową (np. poprzez transportery kasetowe wiążące ATP) [7,8], wydzielanie przez semi-kanały koneksynowe i paneksynowe [9–13], a także przez kanały jonowe zależne od potencjału błonowego [14,15]. Na stężenie nukleotydów zewnątrzkomórkowych ma także wpływ aktywność enzymów znajdujących się na powierzchni komórek, hydrolizujących je do nukleozydów. Zalicza się do nich NTPDazy, syntazę ATP, kinazę difosfonukleozydową, kinazę adenylową i 5'-nukleotydazę (CD73) [16–19].

Nukleotydy zewnątrzkomórkowe nie przechodzą przez błonę komórkową, lecz przekazują sygnał za

**Tabela 1.** Receptory purynergiczne P2 i ich agoniści.

Receptor	Agonista
P2X1-P2X7	ATP
P2Y1	ADP
P2Y2	UTP, ATP
P2Y4	UTP
P2Y6	UDP
P2Y11	ATP
P2Y12	ADP
P2Y13	ADP
P2Y14	UDP-glukoza

pośrednictwem receptorów purynergicznymi P2. Są to specyficzne białka receptorowe, które ze względu na budowę i sposób przekazywania sygnału dzieli się na dwie grupy: P2X i P2Y. Receptory P2X są kanałami jonowymi dla Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup> i aktualnie znanych jest siedem ich typów: P2X1 – P2X7. Z kolei osiem dotychczas opisanych receptorów P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11 - P2Y14), to receptory związane z białkiem G (Gq lub Gi) [20,21]. Kolejną istotną cechą odróżniającą te dwie grupy receptorów jest specyficzność ich ligandów: receptory P2X aktywowane są przez ATP, natomiast P2Y odpowiadają zarówno na stymulację ATP i ADP czyli nukleotydów purynowych, jak i UTP, UDP i UDP-glukozy czyli nukleotydów pirymidynowych. Ponadto, poszczególne receptory P2Y różnią się między sobą powinowactwem do nukleotydów i tak ATP jest agonistą dla receptorów P2Y2 i P2Y11, UDP dla receptora P2Y6, a UDP-glukoza dla receptora P2Y14 [22] (Tabela 1). Wreszcie, różny jest efekt aktywacji receptorów P2Y w zależności od tego, czy są one związane z białkiem Gq czy białkiem Gi. Przyłączenie ligandu do receptorów P2Y związanych z białkiem Gq, czyli P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, prowadzi do aktywacji fosfolipazy C i w konsekwencji do wzrostu stężenia 1,4,5-trifosforanu inozytolu i uwolnienia Ca<sup>2+</sup> z zasobów wewnątrzkomórkowych [23]. W przypadku receptorów P2Y11 dodatkowo stwierdza się zwiększenie aktywności cykazy adenylowej i w efekcie nasiloną syntezę cAMP. Natomiast aktywacja receptorów P2Y związanych z białkiem Gi, czyli P2Y12, P2Y13 i P2Y14 hamuje cykazy adenylową i prowadzi do spadku stężenia cAMP [24].

Aktywacja receptorów P2 utrzymuje się do czasu zhydrolizowania nukleotydów przez wspomniane powyżej enzymy i/lub desensytyzacji lub internalizacji receptora. Degradacja nukleotydów prowadzi nie tylko do obniżenia stężenia ligandu dla specyficznego receptora P2, ale także do pojawienia się

1. Zgodnie z aktualnie przyjętymi zasadami nazewnictwa, poprawną nazwą ATPDazy (EC 3.6.1.5) określanej w piśmiennictwie także jako ekto-apyraza, ATPaza, ADPaza lub ekto-ATPDaza, jest difosfohydrolaza trifosforanów nukleozydów - 1 (NTPDaza 1).

nowego agonisty i możliwej aktywacji kolejnego receptora (np. ADP powstający w wyniku hydrolizy ATP ma powinowactwo do innych receptorów niż ATP). Enzymy hydrolizujące nukleotydy mogą modyfikować reakcje indukowane przez receptory P2 nie tylko poprzez hydrolizę nukleotydów, ale także pośrednio, przyczyniając się do zmiany stężenia adenozyne, która jest kolejnym produktem katalizy ATP i ADP. Aktywacja receptorów adenozynowych P1 (A1, A2, A3) indukuje w komórkach szlaki przekazywania sygnału prowadzące do odpowiedzi komórkowej zwykle przeciwstawnej zjawiskom indukowanych pobudzeniem receptorów P2. Stymulacja receptorów P2 prowadzi na przykład do proliferacji komórek mięśni gładkich, podczas gdy adenozyne działająca poprzez receptory P1 hamuje ten proces [25]. Ponadto, wolne nukleotydy (np. adenozyne) mogą być związane i przetransportowane do komórki przez wyspecjalizowane, błonowe białka transportowe. Ten szlak odzyskiwania puryn umożliwia m.in. uzupełnienie zapasów ATP w komórce.

Złożoność układu purynergicznego wynika nie tylko z istnienia kilkunastu receptorów P2 i P1 i kilku enzymów metabolizujących nukleotydy. Należy pamiętać również o tym, że różne typy komórek charakteryzują się specyficznym dla siebie zestawem tych receptorów i enzymów. Dzięki temu możliwe jest ogromne zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej wywoływanych działaniem nukleotydów.

Celem projektu finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy było zbadanie roli receptorów purynergicznych w migracji komórek śródbłonna. Bezpośrednią przyczyną podjęcia tych badań była ważna obserwacja dokonana podczas analizy fenotypu myszy, których komórki nie syntetyzują *cd39* (*cd39<sup>-/-</sup>*). Stwierdzono wówczas silne upośledzenie powstawania nowych naczyń krwionośnych w nowotworach *in vivo* u tych zwierząt oraz nieprawidłowości w angiogenezie ocenianej *in vitro* [26]. Prawdopodobną przyczyną obserwowanych aberracji było zaburzenie przekazywania sygnału przez śródbłonkowe receptory purynergiczne, co sugerowało związek między aktywnością ATPDazy i stężeniem zewnątrzkomórkowych nukleotydów we krwi a powstawaniem naczyń krwionośnych.

## METODYKA I WYNIKI

Wszystkie doświadczenia przeprowadzone były na ludzkich komórkach śródbłonna izolowanych z żyły pępowinowej (HUVEC). Oceny zmian stężenia wewnątrzkomórkowych jonów wapnia dokonywano metodą fluorescencyjną po inkubacji komórek z barwnikiem fluo-3 AM. Do oceny fosorylacji białek przekąźnikowych oraz ekspresji

**Tabela 2.** Relatywna ekspresja wybranych P2 receptorów w komórkach śródbłonna. Zakres odpowiada ekspresji mRNA receptorów P2Y1, P2Y2 i P2Y4 stwierdzony w sześciu różnych populacjach HUVEC w pasażu 0 i 4.

	Relatywna ekspresja genu P2Y1 (zakres)	Relatywna ekspresja genu P2Y2 (zakres)	Relatywna ekspresja genu P2Y4 (zakres)
pasaż 0	1 (0,51–1,96)	1 (0,47–2,13)	1 (0,36–2,79)
pasaż 4	1,16 (0,88–1,54)	0,98 (0,77–1,23)	4,83 (2,89–8,09)

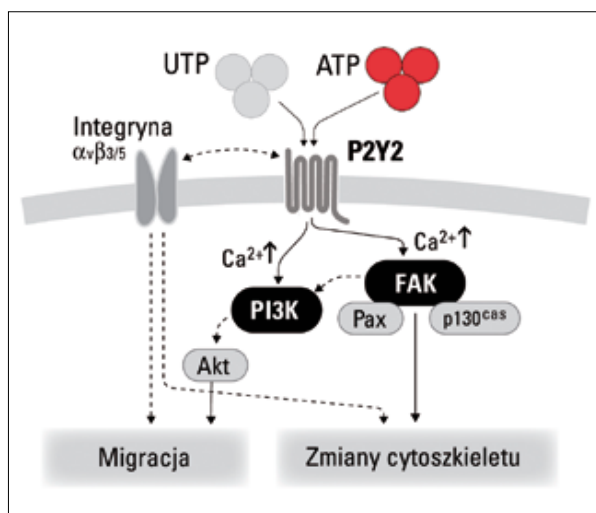
integryn zastosowano metodę Western blot i specyficzne przeciwciała. Migrację komórek badano w kamerze Boydena z zastosowaniem membran o średnicy porów 8  $\mu\text{m}$ . Cytoszkielek komórek oceniano w mikroskopie konfokalnym po wybarwieniu włókien aktynowych falloidyną. Ekspresja genów kodujących receptory P2 w komórkach śródbłonna oceniana była metodą PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem sond Taqman.

## Ekspresja genów kodujących receptory P2 w komórkach śródbłonna w zależności od pasażu

Przeprowadzona przez nas analiza ekspresji genów kodujących wybrane receptory purynergiczne (P2Y1, P2Y2 i P2Y4) w komórkach śródbłonna w młodych (pasaż 0) i starzejących się (pasaż 4) hodowlach ujawniła istotne różnice w nasileniu ekspresji receptora P2Y4 i niewielkie zmiany ekspresji receptorów P2Y1 i P2Y2 (Tabela 2). W komórkach pasażu 4 ekspresja receptora P2Y4 była prawie pięciokrotnie wyższa niż w komórkach pasażu 0. Na tej podstawie możemy przypuszczać, że z wiekiem hodowli zwiększa się wrażliwość komórek na UTP.

## Zmiana stężenia wewnątrzkomórkowych jonów wapnia

Z informacji dostępnych w literaturze wynikało, że wiele typów komórek odpowiada na zewnątrzkomórkowe nukleotydy wzrostem stężenia wewnątrzkomórkowego, wolnego wapnia ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Podobne zjawisko zaobserwowaliśmy w komórkach śródbłonna stymulowanych ATP i UTP. W celu ustalenia źródła  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , tj. określenia, czy jony wapnia uwalniane są z organelli wewnątrzkomórkowych czy pochodzą ze środowiska zewnątrzkomórkowego, komórki były poddane działaniu związku chelatującego wewnątrzkomórkowe jony wapnia BAPTA-AM lub tapsigarginy, która prowadzi do opróżnienia wewnątrzkomórkowych jonów wapnia poprzez selektywne zablokowanie pompy wapniowej w siateczce śródplazmatycznej lub były umieszczone w pożywce bez jonów wapnia, zawierającej dodatkowo związek chelatujący jony wapnia, EGTA.



**Rycina 1.** Schemat szlaków przekazywania sygnału zainicjowanych przez nukleotydy zewnątrzkomórkowe w komórkach śródbłonna, prowadzący do zmian cytoszkieletu i migracji.

W efekcie działania BAPTA-AM i tapsigarginy nie dochodziło do wzrostu stężenia  $[Ca^{2+}]_i$ , w komórkach śródbłonna stymulowanych nukleotydami zewnątrzkomórkowymi (ATP, ADP i UTP), natomiast EGTA nie miał zasadniczego wpływu na zmiany stężenia  $[Ca^{2+}]_i$  indukowane przez ATP i UTP.

UDP nie prowadził do zmian w stężeniu wewnątrzkomórkowego wapnia, a zmiany w odpowiedzi na ADP i 2-metyltio-ADP były znacząco słabsze w porównaniu do ATP i UTP. Stymulacja HUVEC przez  $\alpha, \beta$ -metylen-ATP, agonistę receptorów P2X, nie prowadziła do żadnych zmian w stężeniu wewnątrzkomórkowych jonów wapnia, co potwierdzało poprzednie wyniki wskazujące, że receptory P2X nie odgrywają ważnej roli w odpowiedzi wapniowej komórek śródbłonna.

Ta farmakologiczna analiza wskazywała na udział P2Y receptorów, a zwłaszcza P2Y2 i P2Y1 oraz prawdopodobnie P2Y4, w odpowiedzi śródbłonna na aktywację nukleotydami zewnątrzkomórkowymi.

#### Fosforylacja FAK, paksyliny i p130<sup>cas</sup>

Zmiana stężenia  $[Ca^{2+}]_i$  aktywuje różne szlaki przekazywania sygnału. Pod wpływem ATP i UTP w HUVEC dochodziło do fosforylacji kilku białek. Białka o masie cząsteczkowej około 68, 125 i 130 kDa zidentyfikowaliśmy jako kinazę adhezji ogniskowej p125 (focal adhesion kinase, FAK), p130<sup>cas</sup> i paksylinę. Największa intensywność fosforylacji obserwowana była w ciągu 1–2 minut po stymulacji komórek.

Indukowana przez nukleotydy aktywacja FAK mogła być następstwem aktywacji integrzyn lub/i wzrostu

$[Ca^{2+}]_i$ . Preinkubacja HUVEC z BAPTA-AM i następująca po niej stymulacja komórek przez ATP i UTP nie prowadziła do fosforylacji FAK.

#### Przebudowa cytoszkieletu

Aktywacja FAK może prowadzić do zmiany kształtu komórek i migracji. Pod wpływem ATP i UTP w HUVEC obserwowano wyraźne rozplaszczanie się komórek i tworzenie włókienek naprężeniowych. Zmiany obserwowane w cytoszkielecie pod wpływem ATP i UTP były znacznie mniej wyraźne w komórkach śródbłonna, które preinkubowano z BAPTA-AM, co sugeruje udział jonów wapnia w tych zmianach.

#### Migracja komórek

Zarówno ATP, jak i UTP znacząco nasilały migrację HUVEC. Efektu tego nie zaobserwowaliśmy po aktywacji komórek przez ADP, co wskazuje na to, że receptory P2Y1 specyficzne dla ADP nie biorą udziału w migracji HUVEC (w modelu chemotaksji). Inhibitory kinazy PI3, wortmanina i LY294002, znacząco ograniczały migrację w odpowiedzi na UTP. Te wyniki dowodzą, że aktywacja kinazy PI3 reguluje proces migracji wywołany przez nukleotydy zewnątrzkomórkowe. Preinkubacja komórek z BAPTA-AM również znacząco zmniejszyła migrację pod wpływem UTP, co wskazuje na udział jonów wapnia w migracji.

#### Nasilenie ekspresji integryny $\alpha_v$

Udział receptorów dla witronektyny ( $\alpha_v\beta_3$ ) w adhezji komórek do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, w migracji i angiogenezie jest dobrze udokumentowany. Wiadomo również, że kolokalizacja receptorów P2Y2 z integryną  $\alpha_v\beta_3$  prowadzi do nasilenia migracji komórek [27]. Z naszych obserwacji wynika, że stymulacja HUVEC przez UTP i ATP zwiększa ekspresję  $\alpha_v$  nie wpływając jednocześnie na ekspresję integryny  $\alpha_5$ . Wyniki te sugerują istnienie mechanizmu wiążącego nasilenie ekspresji integrzyn z działaniem nukleotydów na migrację komórek.

#### DYSKUSJA

Przedstawione powyżej wyniki stanowiły pierwszą ilustrację roli, jaką w komórkach śródbłonna pełnią nukleotydy, aktywując szlaki przekazywania sygnału prowadzące do aktywacji integrzyn, przebudowy cytoszkieletu, adhezji i nasilenia ruchliwości komórek.

W komórkach śródbłonna izolowanych z ludzkiej żyły pępowinowej (HUVEC) stwierdzono obecność

10 typów receptorów P2: pięciu receptorów P2X (P2X1, P2X2, P2X4, P2X6, P2X7) oraz pięciu receptorów P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11) ([28–30], nasze nieopublikowane dane). Jednak tylko trzy z tych receptorów, P2Y1, P2Y2 i P2Y4, występują w znaczących ilościach w HUVEC. Z przeprowadzonej przez nas analizy młodych (pasaż 0) i starzejących się hodowli (pasaż 4) wynika, że wraz z pasażowaniem dochodzi do znacznego, prawie pięciokrotnego nasilenia ekspresji genu kodującego receptor P2Y4. Takie zmiany w ekspresji i aktywności P2 receptorów mogą prowadzić do modyfikacji wrażliwości komórek na nukleotydy i w efekcie do indukowania w nich odmiennych odpowiedzi komórkowych. Wyjaśnienie związku między zmianami ekspresji genów P2 w młodych i starzejących się hodowlach może mieć kluczowe znaczenie w zrozumieniu fizjologicznych i patofizjologicznych zjawisk związanych ze starzeniem się organizmu. Aktywacja receptorów purynergicznymi w wielu typach komórek prowadzi do wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego, wolnego wapnia ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Jest to wczesna odpowiedź komórkowa, a wapń pełni w tym przypadku klasyczną rolę przekaźnika drugorzędowego. Poprzez zapoczątkowanie wielu kaskad przekazywania sygnału reguluje on szereg procesów komórkowych, a od oscylacji stężeń  $[Ca^{2+}]_i$ , zależy także ekspresja niektórych genów [31]. Przeprowadzone przez nas doświadczenia wykazały, że ATP, ADP, UTP oraz odporne na hydrolizę analogi nukleotydów (ATP $\gamma$ S oraz ADP $\beta$ S) wywołują w komórkach HUVEC silny wzrost stężenia  $[Ca^{2+}]_i$ . Natomiast żadnych zmian w stężeniu  $[Ca^{2+}]_i$  nie wywoływała aktywacja komórek przez UDP (ligand receptora P2Y6), BzATP (2' i 3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP, selektywny agonista receptorów P2X7 i P2Y11) i  $\alpha$ - $\beta$ -metyleno-ATP ( $\alpha$ - $\beta$ -meATP, selektywny agonista receptorów P2X) w szerokim zakresie analizowanych przez nas stężeń (1–200  $\mu$ M). Ta obserwacja pozwala przypuszczać, że w HUVEC funkcjonalne są tylko receptory P2Y1, P2Y2 i P2Y4. Zablockowanie indukowanego przez nukleotydy wzrostu stężenia  $[Ca^{2+}]_i$  obserwowaliśmy po zastosowaniu BAPTA – związku chelatującego wewnątrzkomórkowe jony wapnia, a także taspigarginy, która prowadzi do opróżnienia wewnątrzkomórkowych jonów wapnia poprzez selektywne zablokowanie pompy wapniowej w siateczce śródplazmatycznej. Żadnego wpływu na odpowiedź komórkową nie miał EGTA – związek chelatujący zewnątrzkomórkowe jony wapnia. Z naszych badań wynika więc, że zależne od ATP, ADP i UTP zmiany w stężeniu  $[Ca^{2+}]_i$  są następstwem uwalniania tych jonów z zasobów wewnątrzkomórkowych i że spowodowane jest to aktywacją receptorów P2Y, a nie P2X.

Też o tym, że w komórkach śródbłonna receptory P2X nie są funkcjonalne potwierdzają także

doniesienia innych autorów [32]. W literaturze nie brak jednak doniesień przeczących temu twierdzeniu. Dotyczą one przede wszystkim udziału receptorów P2X4 w odpowiedzi komórkowej na działanie siły ścinającej. W komórkach śródbłonna izolowanych z tętnicy płucnej i poddanych działaniu takiej siły obserwuje się wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego  $[Ca^{2+}]_i$ . Jest to efekt działania ATP uwalnianego w takich warunkach z komórek do środowiska zewnątrzkomórkowego. Zgodnie z przewidywaniami, zastosowanie w takim układzie doświadczalnym związku chelatującego zewnątrzkomórkowy wapń lub apyrazy – enzymu hydrolizującego ATP i ADP, blokuje odpowiedź wapniową [33]. O roli receptorów P2X w funkcji śródbłonna świadczą też wyniki analiz fenotypu myszy pozbawionych funkcjonalnych genów kodujących receptory p2x1 i p2x4 [34–36].

Jednym z receptorów P2X, którego obecność stwierdza się w komórkach śródbłonna jest P2X7 [37,38]. Nasze badania potwierdziły jego ekspresję na poziomie mRNA [39] i białka (dane nieopublikowane). Ujawniliśmy jego obecność nie tylko w błonie komórkowej, ale także w błonie jądrowej. W literaturze opisywano już wcześniej ekspresję P2X7 w błonie jądrowej neuronów, komórek mięśni gładkich i komórek nabłonkowych narządów jamy brzusznej świnki morskiej [40,41]. Dotychczas nie wiadomo jednak, jaką funkcję pełnią znajdujące się tam receptory. Można jedynie przypuszczać, że otwarcie kanałów jonowych w błonie jądrowej spowodowane aktywacją receptorów P2X7 prowadzi do zwiększenia stężenia  $[Ca^{2+}]_i$  w jądrze komórkowym i w ten sposób wpływa na zachodzące tam procesy. Nie wiadomo jednak, dlaczego aktywacja komórek śródbłonna BzATP – swoistym, syntetycznym agonistą receptorów P2X7, a także zastosowanie agonistów pozostałych śródbłonkowych receptorów P2X nie wywołuje ich aktywacji i odpowiedzi wapniowej. Wyjaśnienie tych zjawisk wymaga dalszych badań.

Aktywacja receptorów P2Y1, P2Y2 i P2Y4 obecnych w komórkach ściany naczynia krwionośnego wiąże się z ich udziałem w bardzo zróżnicowanych zjawiskach. Żadnych wątpliwości nie budzi rola tych receptorów w angiogenezie [42], regulacji napięcia ścian naczyń krwionośnych [43], migracji [27,44] i proliferacji komórek [45,46].

W literaturze znaleźć można także dobrze udokumentowane dane potwierdzające obecność receptora P2Y6 w różnych typach naczyń krwionośnych. Wprawdzie nasze badania nie potwierdziły obecności funkcjonalnego receptora P2Y6 w HUVEC, nie stwierdziliśmy bowiem zmian w stężeniu  $[Ca^{2+}]_i$  w odpowiedzi na UDP, to obecność funkcjonalnego receptora P2Y6 potwierdzona jest m.in.

w śródbłonku aorty myszy [47]. Obserwowany u tych zwierząt rozkurcz aorty następujący po podaniu UDP nie występuje, jeśli doświadczenie także przeprowadzi się u myszy pozbawionych funkcjonalnego genu kodującego receptor P2Y6/p2y6 [47].

Jednym z najciekawszych wyników naszych badań nad indukowaną przez nukleotydy zmianą stężenia  $[Ca^{2+}]_i$  w HUVEC było ujawnienie znacznej heterogenności reakcji pojedynczych komórek. Podczas stymulacji ADP, UTP i ATP komórki nie zawsze reagowały na wszystkie trzy nukleotydy: część z nich odpowiadała na dwóch, a część tylko na jednego agonistę. Komórki różniła także liczba oraz nasilenie pików składających się na odpowiedź wapniową. Naszą uwagę zwróciła również słabnąca wraz z pasażowaniem (od pasażu 1 do 4) odpowiedź HUVEC na ADP. Ponieważ przeprowadzona przez nas analiza ekspresji genu kodującego ten receptor nie wykazuje istotnej różnicy między pasażem 1 a pasażem 4 (Tabela 2), sugeruje to, że w kolejnych pokoleniach komórek spada funkcjonalność tego receptora. W przeciwieństwie do HUVEC, pojedyncze komórki śródbłonkowej linii komórkowej EAhy926 odpowiadają na nukleotydy dokładnie tak samo, jak cała populacja. Heterogenność odpowiedzi pojedynczych komórek na stymulację nukleotydami wynika ze zróżnicowanej ekspresji poszczególnych typów receptorów. Zostało to jednoznacznie potwierdzone przez barwienie immunohistochemiczne HUVEC przeprowadzone z wykorzystaniem aktualnie dostępnych przeciwciał rozpoznających receptory P2. Hipoteza sformułowana przez nas na podstawie uzyskanych wyników zakłada, że komórki śródbłonka są heterogenne zarówno pod względem ekspresji, jak i funkcjonalności receptorów P2. Fizjologiczne znaczenie tego zjawiska nadal pozostaje nie do końca wyjaśnione, choć opisana jest przynajmniej jedna analiza dotycząca zróżnicowanej ekspresji receptorów P2Y w śródbłonku naczyń krwionośnych kosmówki i w płatach łożyska u człowieka [48]. Autorzy publikacji dowiedli nie tylko nierównomiernego rozmieszczenia receptorów P2Y1 i P2Y2 w łożyskowych naczyniach krwionośnych. Z ich pracy jednoznacznie wynika, że aktywacja receptorów P2 obecnych w naczyniach krwionośnych śródbłonka i kosmówki nie aktywuje tych samych szlaków przekazywania sygnału co aktywacja łożyskowych receptorów P2. W efekcie aktywacja tych samych receptorów wywołuje w różnych obszarach odmienną odpowiedź naczynioruchową.

Przeprowadzone przez nas badania wykazały, że pod wpływem ATP i UTP w HUVEC dochodzi do fosforylacji trzech białek przekaźnikowych regulujących adhezję komórkową i migrację: FAK, p130<sup>cas</sup> i paksyliny [49,50]. FAK jest cytoplazmatyczną kinazą tyrozynową, której ekspresja jest charakterystyczna dla

komórek wytwarzających połączenia z macierzą zewnątrzkomórkową lub z innymi komórkami. Jest to białko zaangażowane m.in. w adhezję, migrację, fosforylację białek cytoszkieletu oraz apoptozę [49,50]. Dwa pozostałe białka, które ulegają fosforylacji w odpowiedzi na nukleotydy, p130<sup>cas</sup> oraz paksylina, stanowią element cytoszkieletu i razem z FAK wchodzi w skład ogniskowych kontaktów adhezyjnych.

W toku dalszych prac potwierdziliśmy, że ATP i UTP indukują wyraźne rozplaszczanie komórek i tworzenie włókienek naprężeniowych, a także nasilają migrację komórek [44]. Ani do fosforylacji białek przekaźnikowych, ani do zmian w cytoszkielecie i do migracji komórek nie dochodziło po zastosowaniu BAPTA, chelatora wewnątrzkomórkowego wapnia. Mogliśmy więc stwierdzić, że ujawniona odpowiedź komórkowa zależna jest od wewnątrzkomórkowych zasobów  $Ca^{2+}$  i wywołana jest aktywacją receptorów P2Y2 i prawdopodobnie P2Y4. Aktywacja HUVEC przez ADP, który jest agonistą receptora P2Y1, wywoływała znacznie mniej nasiloną reakcję komórek. Z naszych badań wynika też, że jednym z białek przekazywania sygnału regulującym migrację jest kinaza fosfatydylo-3-inozytoli (PI3K). Jej inhibitory, wortmanina i LY294002, blokują efekt nukleotydów. Doniesienia innych badaczy wskazują jednak także na udział receptorów P2Y1 w odpowiedzi prowadzącej do migracji komórek, a kinazą regulującą ten proces są kinazy aktywowane mitogenami (MAPK) [51].

Innym, stwierdzonym przez nas zjawiskiem charakterystycznym dla HUVEC stymulowanych przez UTP i ATP jest nasilenie ekspresji jednej z cząsteczek adhezyjnych, integryny  $\alpha_v$ . Udział integryny  $\alpha_v\beta_3$  w adhezji komórek do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, w migracji i angiogenezie jest dobrze udokumentowany [52]. Wiadomo również, że kolokalizacja receptorów P2Y2 z integryną  $\alpha_v\beta_3$  prowadzi do nasilenia fosforylacji FAK przez UTP. Wyniki te sugerują istnienie mechanizmu, który wiąże nasilenie ekspresji integryn wywołane działaniem nukleotydów z migracją komórek i są spójne z wcześniejszymi doniesieniami na temat udziału integryn w aktywacji szlaku przekazywania sygnału związanego z FAK [53]. Wiadomo też, że do zapoczątkowania interakcji integryn z cytoszkieletem niezbędny jest wzrost stężenia  $[Ca^{2+}]_i$  [54]. Wreszcie, obecność w receptorze P2Y2 motywu RGD (sekwencji aminokwasowej Arg-Gly-Asp) ma wpływ na kolokalizację tego receptora z integryną  $\alpha_v\beta_3$ . Motyw RGD rozpoznawany jest przez integryny jako specyficzne miejsce wiązania i w ten sposób dochodzi do interakcji receptora P2Y2 i integryny, a w konsekwencji do aktywacji szlaków przekazywania sygnału powiązanych z integrynami, przebudowa cytoszkieletu i migracja komórek [27,55,56]. Mechanizm, który wyjaśniałby nasilenie ekspresji integryny  $\alpha_v$  po

stymulacji komórek przez nukleotydy zewnątrzkomórkowe, nadal pozostaje nieznaną.

Po raz pierwszy fosforylację FAK i paksyliny w komórkach śródbłonna opisano po stymulacji tych komórek śródbłonkowym czynnikiem wzrostu (VEGF) [57,58]. Stosunkowo niedawne doniesienia ujawniają transaktywację receptora dla VEGF (VEGFR-2) przez receptory P2Y2 [42,59,60]. Nadal do wyjaśnienia pozostaje, czy opisane powyżej zjawiska indukowane w HUVEC po stymulacji nukleotydami są zależne od VEGFR-2.

Receptorami indukującymi opisane w pracy zjawiska są prawdopodobnie P2Y2 i P2Y4, dlatego w oparciu o uzyskane wyniki śródbłonkowe receptory P2Y zostały uznane za nową grupę receptorów uczestniczących w procesach zapalnych i angiogenezie.

## PERSPEKTYWY

Przedstawione powyżej wyniki opisują odpowiedź komórek śródbłonna indukowaną przez nukleotydy zewnątrzkomórkowe prowadzącą do migracji komórek i tłumaczą mechanizm tego zjawiska poprzez szlak przekazywania sygnału prowadzący do aktywacji FAK/p130<sup>cas</sup>/paksyliny, regulację ekspresji integryny  $\alpha_v$  i zmiany cytoszkieletu. Ponieważ nasilenie migracji komórek śródbłonna odgrywa ważną rolę w angiogenezie, dalsze badania powinny pójść w kierunku określenia roli receptorów P2 w powstawaniu naczyń krwionośnych, ważnym w przebiegu wielu chorób, takich jak cukrzyca czy choroby nowotworowe.

FAK nie jest jedynym białkiem przekąźnikowym uczestniczącym w odpowiedzi na aktywację śródbłonkowych receptorów P2Y. Zarówno z informacji literaturowych, które ukazały się już po zakończeniu

projektu finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy, jak i z naszych nieopublikowanych danych, wynika, że szlaki purynergiczne prowadzą także do aktywacji kinaz aktywowanych mitogenami (kinazy MAP, MAPK, ang. mitogen-activated protein kinases): kinaz regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym, ang. extracellular signal-regulated kinases – ERK, p38 i kinazy fosforylującej N-terminalną część białka Jun – JNK, a także kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK) [61] i śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) [62]. Wszystkie te kinazy są niezwykle ważne w biologii komórek śródbłonna, ponieważ regulują ekspresję wielu genów związanych z proliferacją, apoptozą i metabolizmem komórek. Jest to kolejny powód, dla którego badania nad rolą zewnątrzkomórkowych nukleotydów w utrzymaniu funkcji śródbłonna (np. poprzez stymulację produkcji odpowiedniej ilości tlenu azotu, ważnego czynnika naczynioprotekcyjnego) powinny być kontynuowane.

Nie ulega wątpliwości, że mimo powszechnego występowania receptorów P2 w komórkach, są one dobrym celem dla farmakologicznej interwencji w odpowiedzi na purynergiczną aktywację. Może warto przypomnieć, że już od wielu lat jednym z najlepiej sprzedawanych leków na światowym rynku jest Clopidogrel, antagonistą receptora P2Y12, skutecznie hamujący aktywację płytek krwi.

## PODZIĘKOWANIA

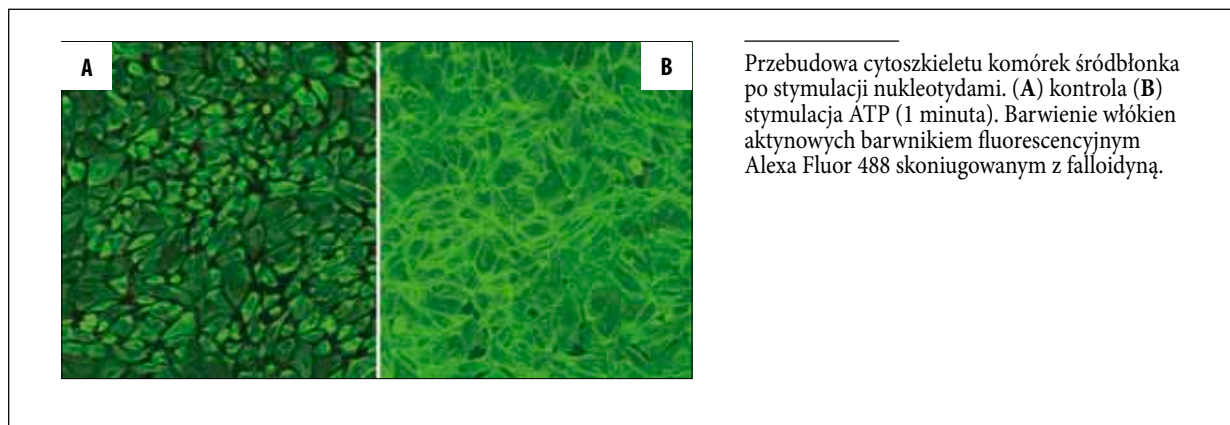
Przedstawione wyniki uzyskano m. in. dzięki funduszom z National Institutes of Health (EK, #HL66167), Juvenile Diabetes Research Foundation (EK, #5-2007-736) oraz Naukowej Fundacji Polpharmy.

## Ramka 1. Stan wiedzy w chwili rozpoczęcia projektu.

1. Od lat powszechnie znane były niektóre reakcje naczyniowe na stymulację nukleotydami, np. skurcz mięśni gładkich naczyń krwionośnych po stymulacji ATP czy agregacja płytek krwi aktywowanych ADP.
2. Znaczący postęp w wyjaśnianiu molekularnego podłoża tych zjawisk nastąpił po sklonowaniu receptorów purynergicznym P2, scharakteryzowaniu związanych z nimi szlaków przekazywania sygnału w różnych typach komórek i tkanek oraz badaniach na myszach pozbawionych funkcjonalnych genów kodujących receptory P2. Stało się jasne, że efektem aktywacji komórek śródbłonna przez zewnątrzkomórkowe nukleotydy jest odpowiedź komórkowa podobna do tej, jaką wywołują klasyczne już związki regulujące funkcje tych komórek, np. śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) i trombina.
3. Bezpośrednią przyczyną podjęcia badań była obserwacja sugerująca związek między stężeniem zewnątrzkomórkowych nukleotydów we krwi a powstawaniem naczyń krwionośnych.



### Ramka 1 c.d. Stan wiedzy w chwili rozpoczęcia projektu.



### Ramka 2. Co przyniosła realizacja grantu Naukowej Fundacji Polpharmy.

1. Uznanie śródbłonkowych receptorów P2Y za nową grupę receptorów uczestniczących w procesach zapalnych i angiogenezie.
2. Odkrycie, iż nukleotydy zewnątrzkomórkowe aktywują w komórkach śródbłonka szlaki przekazywania sygnału prowadzące do aktywacji integryn, przebudowy cytoszkieletu, adhezji i nasilenia ruchliwości komórek.

### Ramka 3. Dalsze kierunki badań.

1. Kontynuowane są badania nad rolą receptorów P2 w powstawaniu naczyń krwionośnych, procesie ważnym w przebiegu wielu chorób, takich jak cukrzyca czy choroby nowotworowe, a także w patologicznej przebudowie naczyń (stenozy i restenozy) np. po zabiegach angioplastyki.
2. Kolejne opisywane purynergiczne szlaki przekazywania sygnału ujawniają związek nukleotydów z aktywnością kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK), które regulują ekspresję wielu genów związanych z proliferacją, apoptozą i metabolizmem komórek. Wskazuje to na ważną rolę zewnątrzkomórkowych nukleotydów w utrzymaniu prawidłowej funkcji komórek śródbłonka.
3. Receptory P2 są dobrym celem dla farmakologicznej interwencji, m.in. poprzez nasilenie degradacji nukleotydów. Znany jest już sposób uzyskiwania rozpuszczalnej formy najważniejszego naczyniowego enzymu hydrolizującego nukleotydy zewnątrzkomórkowe, NTPDazy-1. Prowadzone są badania nad stworzeniem stentów uwalniających NTPDazę-1.

### Piśmiennictwo:

1. Burnstock G, Kennedy C: A dual function for adenosine 5'-triphosphate in the regulation of vascular tone. Excitatory cotransmitter with noradrenaline from perivascular nerves and locally released inhibitory intravascular agent. *Circ Res*, 1986; 58: 319–330
2. Sima B, Macdonald L, Marton LS et al: Effect of P2-purinoceptor antagonists on hemolysate-induced and adenosine 5'-triphosphate-induced contractions of dog basilar artery *in vitro*. *Neurosurgery*, 1996; 39: 815–821; discussion 821–812

3. Gerasimovskaya EV, Woodward HN, Tucker DA et al: Extracellular ATP is a pro-angiogenic factor for pulmonary artery vasa vasorum endothelial cells. *Angiogenesis*, 2008; 11: 169–182
4. Montiel M, de la Blanca EP, Jimenez E: P2Y receptors activate MAPK/ERK through a pathway involving PI3K/PDK1/PKC-zeta in human vein endothelial cells. *Cell Physiol Biochem*, 2006; 18: 123–134
5. Burnstock G: Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*, 2006; 147(Suppl.1): S172–181
6. Bodin P, Burnstock G: Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2001; 38: 900–908
7. Naumann N, Siratska O, Gahr M et al: P-glycoprotein expression increases ATP release in respiratory cystic fibrosis cells. *J Cyst Fibros*, 2005; 4: 157–168
8. Ballerini P, Di Iorio P, Ciccarelli R et al: Glial cells express multiple ATP binding cassette proteins which are involved in ATP release. *Neuroreport*, 2002; 13: 1789–1792
9. Praetorius HA, Leipziger J: ATP release from non-excitabile cells. *Purinergic Signal*, 2009; 5(4): 433–446
10. Ransford GA, Fregien N, Qiu F et al: Pannexin 1 Contributes to ATP Release in Airway Epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009; 41(5): 525–534
11. Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E et al: Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal*, 2008; 1: ra6
12. Schock SC, Leblanc D, Hakim AM et al: ATP release by way of connexin 36 hemichannels mediates ischemic tolerance *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008; 368: 138–144
13. Gomes P, Srinivas SP, Van Driessche W et al: ATP release through connexin hemichannels in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005; 46: 1208–1218
14. Romanov RA, Rogachevskaja OA, Khokhlov AA et al: Voltage dependence of ATP secretion in mammalian taste cells. *J Gen Physiol*, 2008; 132: 731–744
15. Liu HT, Toychiev AH, Takahashi N et al: Maxi-anion channel as a candidate pathway for osmosensitive ATP release from mouse astrocytes in primary culture. *Cell Res*, 2008; 18: 558–565
16. Gordon EL, Pearson JD, Slakey LL: The hydrolysis of extracellular adenine nucleotides by cultured endothelial cells from pig aorta. Feed-forward inhibition of adenosine production at the cell surface. *J Biol Chem*, 1986; 261: 15496–15507
17. Kaczmarek E, Koziak K, Seigny J et al: Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem*, 1996; 271: 33116–33122
18. Zimmermann H: Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2000; 362: 299–309
19. Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y et al: Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res*, 2004; 95: 814–821
20. Ralevic V, Burnstock G: Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev*, 1998; 50: 413–492
21. Abbracchio MP, Burnstock G: Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther*, 1994; 64: 445–475
22. Burnstock G: Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*, 2007; 64: 1471–1483
23. Waldo GL, Harden TK: Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol*, 2004; 65: 426–436
24. Bodor ET, Waldo GL, Blaesus R et al: Delineation of ligand binding and receptor signaling activities of purified P2Y receptors reconstituted with heterotrimeric G proteins. *Purinergic Signal*, 2004; 1: 43–49
25. Burnstock G: Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002; 22: 364–373
26. Goepfert C, Sundberg C, Seigny J et al: Disordered cellular migration and angiogenesis in cd39-null mice. *Circulation*. 2001; 104: 3109–3115
27. Bagchi S, Liao Z, Gonzalez FA et al: The P2Y2 nucleotide receptor interacts with alpha v integrins to activate G $\alpha$  and induce cell migration. *J Biol Chem*, 2005; 280: 39050–39057
28. Harrington LS, Evans RJ, Wray J et al: Purinergic 2X1 receptors mediate endothelial dependent vasodilation to ATP. *Mol Pharmacol*, 2007; 72: 1132–1136
29. Ray FR, Huang W, Slater M et al: Purinergic receptor distribution in endothelial cells in blood vessels: a basis for selection of coronary artery grafts. *Atherosclerosis*, 2002; 162: 55–61
30. Wang L, Karlsson L, Moses S et al: P2 receptor expression profiles in human vascular smooth muscle and endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002; 40: 841–853
31. Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS: Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression [see comments]. *Nature*, 1998; 392: 933–936
32. Tanaka N, Kawasaki K, Nejime N et al: P2Y receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling increases human vascular endothelial cell permeability. *J Pharmacol Sci*, 2004; 95: 174–180
33. Yamamoto K, Sokabe T, Ohura N, et al. Endogenously released ATP mediates shear stress-induced Ca<sup>2+</sup> influx into pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 285: H793–803
34. Harrington LS, Mitchell JA: P2X1 receptors and the endothelium. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005; 100(Suppl.1): 111–112
35. Harrington LS, Mitchell JA: Novel role for P2X receptor activation in endothelium-dependent vasodilation. *Br J Pharmacol*, 2004; 143: 611–617
36. Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T et al: Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med*, 2006; 12: 133–137
37. Chiao CW, Tostes RC, Webb RC: P2X7 receptor activation amplifies lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity via interleukin-1 beta release. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008; 326: 864–870
38. Ramirez AN, Kunze DL: P2X purinergic receptor channel expression and function in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002; 282: H2106–2116
39. von Albertini M, Palmetshofer A, Kaczmarek E et al: Extracellular ATP and ADP activate transcription factor NF-kappa B and induce endothelial cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 248: 822–829
40. Atkinson L, Milligan CJ, Buckley NJ et al: An ATP-gated ion channel at the cell nucleus. *Nature*, 2002; 420: 42

41. Menzies J, Paul A, Kennedy C: P2X7 subunit-like immunoreactivity in the nucleus of visceral smooth muscle cells of the guinea pig. *Auton Neurosci*, 2003; 106: 103–109
42. Rumjahn SM, Baldwin KA, Buxton IL: P2y receptor-mediated angiogenesis *via* vascular endothelial growth factor receptor 2 signaling. *Proc West Pharmacol Soc*, 2007; 50: 58–60
43. Guns PJ, Korda A, Crauwels HM et al: Pharmacological characterization of nucleotide P2Y receptors on endothelial cells of the mouse aorta. *Br J Pharmacol*, 2005; 146: 288–295
44. Kaczmarek E, Erb L, Koziak K et al: Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thromb Haemost*, 2005; 93: 735–742 *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Fundacji Naukowej Polpharmy*
45. Gerasimovskaya EV, Ahmad S, White CW et al: Extracellular ATP is an autocrine/paracrine regulator of hypoxia-induced adventitial fibroblast growth. Signaling through extracellular signal-regulated kinase-1/2 and the Egr-1 transcription factor. *J Biol Chem*, 2002; 277: 44638–44650
46. Van Daele P, Van Coevorden A, Roger PP et al: Effects of adenine nucleotides on the proliferation of aortic endothelial cells. *Circ Res*, 1992; 70: 82–90
47. Bar I, Guns PJ, Metallo J et al: Knockout mice reveal a role for P2Y6 receptor in macrophages, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 2008; 74: 777–784
48. Buvinic S, Poblete MI, Donoso MV et al: P2Y1 and P2Y2 receptor distribution varies along the human placental vascular tree: role of nucleotides in vascular tone regulation. *J Physiol*, 2006; 573: 427–443
49. Romer LH, McLean N, Turner CE et al: Tyrosine kinase activity, cytoskeletal organization, and motility in human vascular endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 1994; 5: 349–361
50. Richardson A, Parsons T: A mechanism for regulation of the adhesion-associated proteintyrosine kinase pp125FAK [published erratum appears in *Nature* 1996 Jun 27;381(6585): 810]. *Nature*, 1996; 380: 538–540
51. Shen J, DiCorleto PE: ADP stimulates human endothelial cell migration *via* P2Y1 nucleotide receptor-mediated mitogen-activated protein kinase pathways. *Circ Res*, 2008; 102: 448–456
52. Kronenwett R, Graf T, Nedbal W et al: Inhibition of angiogenesis *in vitro* by alphav integrin-directed antisense oligonucleotides. *Cancer Gene Ther*, 2002; 9: 587–596
53. Shattil SJ, Haimovich B, Cunningham M et al: Tyrosine phosphorylation of pp125FAK in platelets requires coordinated signaling through integrin and agonist receptors. *J Biol Chem*, 1994; 269: 14738–14745
54. Nebe B, Bohn W, Sanftleben H et al: Induction of a physical linkage between integrins and the cytoskeleton depends on intracellular calcium in an epithelial cell line. *Exp Cell Res*, 1996; 229: 100–110
55. Erb L, Liu J, Ockerhausen J et al: An RGD sequence in the P2Y(2) receptor interacts with alpha(V)beta(3) integrins and is required for G(o)-mediated signal transduction. *J Cell Biol*, 2001; 153: 491–501
56. Liao Z, Seye CI, Weisman GA et al: The P2Y2 nucleotide receptor requires interaction with alpha v integrins to access and activate G12. *J Cell Sci*, 2007; 120: 1654–1662
57. Abedi H, Zachary I: Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem*, 1997; 272: 15442–15451
58. Avraham HK, Lee TH, Koh Y et al: Vascular endothelial growth factor regulates focal adhesion assembly in human brain microvascular endothelial cells through activation of the focal adhesion kinase and related adhesion focal tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 2003; 278: 36661–36668
59. Seye CI, Yu N, Gonzalez FA et al: The P2Y2 nucleotide receptor mediates vascular cell adhesion molecule-1 expression through interaction with VEGF receptor-2 (KDR/Flk-1). *J Biol Chem*, 2004; 279: 35679–35686
60. Rumjahn SM, Yokdang N, Baldwin KA et al: Purinergic regulation of vascular endothelial growth factor signaling in angiogenesis. *Br J Cancer*, 2009; 100: 1465–1470
61. da Silva CG, Jarzyna R, Specht A et al: Extracellular nucleotides and adenosine independently activate AMP-activated protein kinase in endothelial cells: involvement of P2 receptors and adenosine transporters. *Circ Res*, 2006; 98: e39–47
62. da Silva CG, Specht A, Wegiel B et al: Mechanism of purinergic activation of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells. *Circulation*, 2009; 119: 871–879

# Białko hnRNPK – wielofunkcyjna platforma integrująca sygnalizację komórkową

hnRNPK protein – multifunctional platform which integrates cellular signaling

Jerzy Ostrowski<sup>1,2</sup>,  
Michał Mikula<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Klinika Gastroenterologii i Hepatologii, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

<sup>2</sup> Zakład Genetyki Onkologicznej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2002 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem prof. Jerzego Ostrowskiego grant na realizację projektu badawczego pt. *Wpływ insuliny na metabolizm mitochondriów: rola białka K.*

## Streszczenie

Białko hnRNPK (białko K) dzięki modułowej budowie stanowi „platformę dokującą”, umożliwiającą oddziaływanie między jego partnerami molekularnymi, białkami i kwasami nukleinowymi. Wysoka interaktywność białka K jest regulowana poprzez jego modyfikacje potranslacyjne. Białko K wykazuje konstytutywną ekspresję i jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Lokalizuje się w jądrze komórkowym, cytoplazmie, błonach i organellach komórkowych. Spośród licznych funkcji przypisywanych białku K najlepiej udokumentowane dotyczą procesów regulacji ekspresji genów.

**Słowa kluczowe:** białko K • ekspresja genów • mitochondria • choroba nowotworowa • zespół metaboliczny

## Summary

hnRNPK protein (K protein) contains multiple modules acting as a docking platform which integrates cross-talk between its molecular partners, proteins and nucleic acids. The high interactivity of protein K is regulated by posttranslational modifications. It reveals a constitutive expression and is essential for the proper functioning of the cell. K protein is localized in the nucleus, cytoplasm, cell membranes and cellular organelles. Among the many functions attributed to K protein, the best documented are implicated in a regulation of gene expression.

**Key words:** hnRNPK protein • gene expression • mitochondria • neoplastic disease • metabolic syndrome

Wpłynęło: 01-12-2010  
Zaakceptowano: 12-01-2011  
Opublikowano: 30-03-2011

---

**Adres do korespondencji:**  
prof. dr hab. med. Jerzy  
Ostrowski, Centrum Onkologii,  
ul. Roentgena 5,  
02-781 Warszawa, e-mail:  
jostrow@warman.com.pl

## WSTĘP

Pierwotne transkrypty komórek eukariotycznych związane są z kompleksami białkowymi hnRNP (*ang. heterogenous nuclear ribonucleoproteins*), co umożliwia ich dojrzewanie, eksport mRNA z jądra komórkowego do cytoplazmy i translację. W skład kompleksu hnRNP wchodzi 20 białek jądrowych [1]; jednym z nich jest białko K (hnRNPK). Reprezentuje ono, wraz z wykazującym podobieństwo funkcjonalne białkiem SAM68 (*ang. 68-kDa Src substrate associated during mitosis*) [2], osobną klasę czynników wiążących kwasy nukleinowe, regulujących ekspresję genów i zaangażowanych w przekazywanie sygnałów komórkowych [3,4].

Białko K może być uznane za składnik metabolizmu podstawowego o konstytutywnej ekspresji: 1) występuje w cytoplazmie, jądrze komórkowym, błonach i organellach komórkowych, 2) lokalna struktura chromatyny w obrębie promotora genu *hnRNPK* wykazuje właściwości charakterystyczne dla promotorów genów metabolizmu podstawowego (*ang. housekeeping genes*) [5], a jego ekspresja pozostaje na względnie stałym poziomie, 3) jest niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania komórki, a transgeniczne myszy pozbawione białka K giną na wczesnych etapach embriogenezy. Homologi białka K są odnajdywane w organizmach owadów, robaków i drożdży. Wykazują one podobieństwo w sekwencji i są kodowane przez geny o podobnej długości do genu ludzkiego białka K [6,7].

Blisko 10 lat temu – w pierwszym konkursie na granty naukowe, rozpisany przez Naukową Fundację Polpharmy – zyskałem możliwość realizacji projektu badawczego zatytułowanego “Wpływ insuliny na metabolizm mitochondriów: rola białka K”. W projekcie tym przedstawiłem hipotezy badawcze sformułowane na podstawie wyników własnych badań nad rolą białka K, trwających już wówczas od ponad 10 lat. Początkowo moje prace prowadziłem w laboratorium dra Karola Bomsztyka, w szpitalu uniwersyteckim Uniwersytetu Washingtona (Seattle, USA), a następnie w Pracowni Biologii i Gastroenterologii Molekularnej Kliniki Gastroenterologii CMKP i Centrum Onkologii-Instytutu w Warszawie. Zaproszenie do podsumowania wyników badań sfinansowanych ze środków Fundacji stało się podstawą do szerszego przedstawienia roli białka K w metabolizmie komórki.

## MODUŁOWA BUDOWA DETERMINUJE FUNKCJE BIAŁKA K

Białko K stanowi „platformę dokującą” dla molekularnych składników sygnalizacji komórkowej,

umożliwiająca oddziaływanie pomiędzy kompleksującymi z nim kwasami nukleinowymi i białkami [3,4]. W modułowej budowie białka K występuje sygnałna sekwencja lokalizacji jądrowej, odpowiedzialna za transport białka do jądra komórkowego, brak natomiast sekwencji, z udziałem której byłoby ono importowane do mitochondriów.

Za kompleksowanie RNA przez białko K odpowiadają domeny wiążące kwasy nukleinowe: RNP (motyw rozpoznający RNA), cztery powtórzenia GRGG, domena palca cynkowego i 3 ewolucyjnie konserwowane domeny KH [8,9]. Domena KH, która wykazuje niemal całkowitą zgodność pomiędzy *X. laevis* i ssakami, składa się z około 70 aminokwasów i jest najczęściej występującym motywem wiążącym RNA. Została zidentyfikowana w ponad 100 białkach, z których większość zawiera 2–4 domeny KH [10]. Dwa drożdżowe homologi białka K (Hek1 i Hek2) zawierają w swej strukturze trzy domeny KH, wiążące się do sekwencji poliC i poliU RNA [11]. Mutacja w obrębie domeny KH2 ludzkiego białka FMR1 jest przyczyną zespołu łamliwego chromosomu X, prowadzącą do genetycznie uwarunkowanego upośledzenia umysłowego.

Białko K wiąże RNA oraz jedno- i dwuniciowe DNA poprzez sekwencje homopirymidynowe/homopurynowe (GGGG/CCCC) obecne między innymi w promotorze P1 *c-myc*, w sekwencji κB, w regionie regulacyjnym genu kinazy tymidynowej i w wielu innych genach (3). W badaniach z użyciem metody SELEX (*ang. Systematic Evolution of Ligands by EXponential Amplification*) [12] białko K wiązało pojedyncze 6–7 nukleotydowe sekwencje RNA bogate w cytozyny (*ang. C-rich patches*). Z kolei wyniki badań własnych wskazują, że interakcje białka K z RNA zachodzą dzięki obecności trzech konsensusowych sekwencji nukleotydowych: CCAUCN<sub>2-7</sub> wCCCwN<sub>7-18</sub> UCAYC, gdzie „w” reprezentuje adeninę lub uracyl, a „Y” cytozynę lub uracyl, odpowiadających prawdopodobnie za wiązanie RNA do trzech domen KH białka K [13]. RNA jest wiązane przez 3 domeny KH silniej niż przez pojedyncze domeny KH [14,15].

Badania wiązania RNA przez białko K prowadziliśmy trzema uzupełniającymi się metodami: z użyciem koimmunoprecypitacji RNA, systemu trójhybrydowego i metody SAGE (Serial Analysis of Gene Expression). Wykazaliśmy, że białko K wiąże setki transkryptów, pośrednio lub bezpośrednio. Znaczący odsetek wiążanego RNA stanowiły niekodujące transkrypty z nici lekkiej genomu mitochondrialnego oraz antysensowne transkrypty genomu jądrowego [13,14,16]. Z kolei wiązanie mRNA zachodzi głównie poprzez sekwencje z regionów

niekodującego końca 3' (3'UTR – *ang.* 3' *untranslated region*) oraz kodonu stop, które zawierają m.in. motywy odpowiedzialne za stabilność, translację i obróbkę mRNA. Przymuszczenie taka lokalizacja wiązanych sekwencji odpowiada za transport mRNA do subkompartamentów komórkowych.

Interakcje białka K z innymi białkami zachodzą w obrębie interaktywnej domeny KI (*ang.* *K protein interactive domain*), pozbawionej trzeciorzędowej struktury przestrzennej [17]. Rejon domeny KI wiąże m.in. PKC $\delta$ , kinazy z rodziny Src, protoonkoproteinę Vav, Zik1, Eed, YB-1, a także białka wirusowe (HCV i HSV) [3,4,16]. Zawiera on trzy bogate w proliny powtórzenia wiążące domeny SH3 oraz miejsce wiązania kinazy białkowej fosforylującej białko K (KPK), które nie pokrywa się z domenami SH3 [17,18]. Spośród ponad 114 białek wiązanych przez białko K [19], 22 białka były wcześniej zidentyfikowane jako składowe kompleksu Grb2, a 29 białek znaleziono w kompleksach białkowych tworzących komórkowe centra inicjacji rozprzestrzeniania.

Białko K jest fosforylowane *in vitro* przez kinazy serynowo-treoninowe, w tym kinazę białkową C (PKC) i kinazę kazeinową 2 (CK2) oraz kinazy tyrozynowe Scr i Lck. Zawiera 73 potencjalne miejsca fosforylacji (32 seryny, 24 treoniny i 17 tyrozyn), a modelowanie białka K wskazuje, że większość z nich lokalizuje się na powierzchni cząsteczki i występuje w otoczeniu sekwencji konsensusowych dla kinazy białkowej II zależnej od Ca<sup>2+</sup>/kalmoduliny, CK1 i CK2, kinazy syntazy glikogenowej-3, kinazy cyklinozależnej 1, kinazy rybosomalnej S6, PKC [20]. Badania własne zidentyfikowały 13 miejsc fosforylowanych *in vivo* i wykazały, że CK 1 i 2 fosforylują *in vitro* łącznie 20 seryn lub treonin w sekwencji białka K [20]. Tyrozynową fosforylację białka K w hodowlach komórkowych aktywują m.in. interleukina-1, estry forbolu, stres oksydacyjny oraz insulina. Podobny efekt obserwowano w wątrobie myszy po wstrzyknięciu insuliny do żyły wrotnej [21,22].

Białko K dzięki wielu domenom umożliwia wzajemne oddziaływanie i komunikowanie jego molekularnych partnerów, pozostając jednocześnie pod kontrolą własnych potranslacyjnych modyfikacji, generowanych przez związane enzymy. Kinaza c-Src związana przez białko K aktywuje pozostającą w kompleksie kinazę KPK. Fosforylacja tyrozyn w pozycji 75, 220, 230, 234, 380 nasila wiązanie przez białko K kinazy Lck, protoonkoproteiny Vav oraz PKC $\delta$ , która fosforyluje serynę 302, zlokalizowaną w środku domeny KI białka K [3,4,18]. Białko K może także modulować globalną aktywność kinaz szlaku MAPK w odpowiedzi na sygnały

proliferacyjne, a tym samym regulować odpowiedź komórkową na sygnały mitotyczne [23].

#### UDZIAŁ BIAŁKA K W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

Białko K może zarówno aktywować, jak i hamować ekspresję genów na poziomie remodelowania chromatyny, transkrypcji, wycinania intronów, regulacji stabilności RNA i translacji [3,4].

W komórkach eukariotycznych synteza pre-mRNA i większości krótkich nuklearnych snRNA zachodzi z udziałem polimerazy RNA II (RNAPII), a w skład kompleksów transkrypcyjnych wchodzi m.in. białka z rodziny hnRNP, w tym białko K. Własne, jeszcze niepublikowane badania wykazały, że białko K wiąże się do *loci* licznych genów, w tym bezpośrednio wczesnych oraz U1 i U2 snRNA, funkcjonalnie powiązanych z procesem składania mRNA. Nagromadzenie białka K w obrębie promotorów tych genów koreluje z ilością związanej RNAPII. Eksperymentalne wyciszenie ekspresji białka K z użyciem siRNA hamuje indukowaną ekspresję genów wczesnych i zmienia stabilność oraz składanie transkryptu genu wczesnego *EGR-1* w trakcie odpowiedzi na sygnały mitotyczne [24,25].

Działając synergistycznie z białkiem TBP (*ang.* *TA-TA-binding protein*) białko K zwiększa transkrypcję genu *c-myc* [3], natomiast poprzez wiązanie do 3 powtórzeniowych sekwencji w obrębie promotora genu receptora lipoproteiny o niskiej gęstości (*LDLR*) aktywuje jego ekspresję [26]. Białko K wspólnie z białkiem C/EBP hamuje transkrypcję genu *agp* z białkiem Pur $\alpha$  – ekspresję genu *CD43* [3].

Struktura chromatyny w obrębie *loci* danego genu decyduje o poziomie jego ekspresji. Białko K oraz jego drożdżowe homologi (białka Hek1 i Hek2) należą do czynników modyfikujących chromatynę. Drożdżowe homologi białka K współuczestniczą w regulacji funkcjonowania telomerów i są stałym elementem składowym chromatyny [27]. W jądrze komórkowym białko K oddziałuje z białkiem Eed, z grupy białek Polycomb, odpowiedzialnych za remodelowanie chromatyny [27]. Eed w kompleksie z metylotransferazą histonową, Ezh2, metyluje lizynę 9 i 27 histonu 3. W systemie dwuhybrydowym białko K reaguje z białkiem rusztowaniowym SAF-B (*ang.* *scaffold attachment factor-B*) [28], kolejnym składnikiem macierzy jądrowej.

Procesowanie prekursorowych mRNA (pre-mRNA) prowadzi do usuwania intronów i składania eksonów w dojrzałe mRNA. 90% ludzkich genów podlega alternatywnemu składaniu eksonów [29]. Udział

białka K w procesie wycinania intronów z pre-mRNA został opisany dla transkryptu genu kurzej  $\beta$ -tropomiozyny [3]. Zmianie poziomu białka K towarzyszą zaburzenia procesu prawidłowego składowania 50% testowanych pre-mRNA genów, zaangażowanych w proces apoptozy [30]. Białko K pełni także rolę głównego regulatora alternatywnego składowania genu *Bcl-x*, w następstwie którego powstają dwie główne izoformy o przeciwstawnym działaniu: proapoptyczna *Bcl-xS* i antyapoptyczna *Bcl-xL*. Nadmiar białka K hamuje syntezę *Bcl-xS* [31]. Agregacja białka K z pentanukleotydową sekwencją mikrosatelitarną intronu 9 pre-mRNA *SCA10* powoduje utratę aktywności białka K i wywołuje proces apoptozy w mechanizmie translokacji kinazy PKC $\delta$  do mitochondriów i aktywacji kaspazy 3. W następstwie tego procesu dochodzi do rozwoju ataksji rdzeniowo-mózdkowej, powodowanej ekspansją powtórzeń mikrosatelitarnych [32].

Białko K jest czynnikiem wyciszającym translację mRNA lipooksygenazy-15 (LOX), kluczowego enzymu w różnicowaniu komórek linii erytroidalnej, poprzez związanie domen KH białka K i hnRNP-E1 do elementu DICE (*ang. differentiation-control element*) w obszarze 3'UTR transkryptu genu *LOX* (3). Białko K jest inhibitorem translacji mRNA receptora androgenowego (AR), regulującym ekspresję genów androgeno-zależnych i proliferację komórek raka stercza. Elementy wiążące białko K zidentyfikowano w obszarach 5'UTR i 3'UTR mRNA *AR* [33]. Białko K stabilizuje mRNA gastryny [34] i mRNA fosforylasy tymidyny [35], a także hamuje translację ludzkiego wirusa papilloma 16 L2 [3].

## BIAŁKO K A ROZROST NOWOTWOROWY

Wzór rozdziału w elektroforezie dwukierunkowej izoform białka K wskazuje na posttranslacyjne modyfikacje tego białka oraz alternatywne składanie mRNA *hnRNP-K* w odpowiedzi na działanie czynników mitogennych [36]. Monoklonalne przeciwciała (mAB B4B6) znakowały cztery izoformy białka K o długości 458, 459, 463 i 464 aminokwasów: izoformy B i D były charakterystyczne dla komórek spoczynkowych, zaś izoformy A i C – dla komórek proliferujących [37]. Ta zróżnicowana ekspresja izoform białka K jest być może powiązana z alternatywnym składaniem mRNA *hnRNP-K* i odzwierciedla „normalny” bądź „proliferujący” fenotyp komórek. W badaniach własnych wykazaliśmy podwyższoną ekspresję białka K na poziomie mRNA, zwiększoną ilość samego białka w jądrach komórkowych oraz wzrost tyrozynowej fosforylacji białka K w proliferujących komórkach szczurzych hepatocytów linii HTC-IR, w regenerującej wątrobie myszy po zabiegu częściowej resekcji oraz w guzach wątroby u myszy [38].

Białko K reguluje ekspresję onkogenów. Wiąże polipirymidynowy element DNA w obrębie promotora *eiF4E* aktywując procesy jego transkrypcji, a zwiększona ekspresja białka K nasila podziały komórkowe zależne od transkrypcji genu *eiF4E*. Podwyższony poziom białka K zwiększa także aktywność promotorów *c-Myc* i *c-Src* [3], pełni rolę koaktywatora ekspresji genów zależnych od p53 (*p21* i *mdm2*), a samo podlega reakcji ubikwitynylacji przez białko MDM2 [39]. Tworząc kompleksy z p21-lincRNA (*ang. large intergenic noncoding RNA – lincRNA*), białko K „opłaszcz” chromatynę w obrębie loci genów zależnych od p53, powodując ich wyciszenie [40]. Białko K oddziałuje z i reguluje aktywność licznych kinaz białkowych.

Powyższe przesłanki wskazują na udział białka K w procesie nowotworzenia, a jego zwiększoną ekspresję opisano w raku jelita grubego, prostaty, przełyku, płuc, czerniaku [41–45]. W rakach jelita grubego mRNA *hnRNP-K* podlega edytowaniu, w następstwie czego dochodzi do podstawienia guaniny w pozycji 274 przez adeninę [46]. Badania własne, analizujące tkankowe transkryptomy i proteomy w prawidłowej błonie śluzowej, w gruczolakach i rakach jelita grubego wykazały wzrost ekspresji białka K w tkance nowotworowej jedynie na poziomie białka [47]. Wykazano ponadto, że jest ono istotnym składnikiem kompleksów białkowych regulujących tempo migracji komórek [48], przez co może mieć udział w uzyskiwaniu przez komórki nowotworowe cech złośliwości, czyli zdolności do naciekania sąsiednich tkanek i tworzenia odległych przerzutów [49]. Białko K jest uważane za potencjalny cel w farmakologicznym leczeniu chorób nowotworowych i infekcji wirusowych.

## BIAŁKO K A MITOCHONDRIA

Białko K integruje kaskady sygnalizacyjne komórki z procesami zachodzącymi na terenie mitochondriów (mt). Lokalizuje się głównie w wewnętrznej błonie mt, a jego import do mt wymaga nakładu energii, nie zależy od potencjału błonowego wewnętrznej błony mt i zachodzi prawdopodobnie z udziałem białek opiekuńczych (mtHSP70 i mtHSP60) [50]. Białko K wiąże z dużym powinowactwem transkrypty sensowne i antysensowne genów kodowanych przez mtDNA [12] oraz reguluje czas ich półtrwania [50]. Powinowactwo białka K do kwasów nukleinowych jest regulowane poziomem fosforylacji jego reszt tyrozynowych i jest powiązane z aktywnością szlaków sygnałowych, indukowanych insuliną [20,51]. Insulina modyfikuje interakcje transkryptów z białkiem K i aktywuje przenoszenie jądrowych mRNA kodujących mitochondrialne białka w pobliże mt, gdzie podlegają

translacji. Insulina aktywuje ponadto import białka K do mt *in vitro* i *in vivo* oraz nasila wiązanie białka K do mtDNA [51]. Tym samym białko K może pełnić rolę mediatora odpowiedzi mt na działanie insuliny.

Za przemiany energetyczne w mt odpowiada pięć kompleksów białkowych, składających się na łańcuch oddechowy. Przemianom energetycznym w mt towarzyszy powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS), które choć potencjalnie szkodliwe, są także wykorzystywane w szlakach przekazywania sygnału i niektórych biogenezach. Zaburzenia energetyczne leżą u podłoża rozwoju niektórych chorób metabolicznych, w tym cukrzycy typu 2 i otyłości. Z kolei otyłość trzewna skojarzona z hiperinsulinizmem i insulinoopornością prowadzi do rozwoju zespołu metabolicznego. Bezpośrednią przyczyną insulinooporności może być hamowanie przez kwasy tłuszczowe aktywności transporterów glukozy, zależnych od działania insuliny z następowym wzrostem stężenia trójglicerydów w wątrobie i mięśniach szkieletowych, zmniejszoną mitochondrialną aktywnością oksydacyjną kwasów tłuszczowych oraz obniżoną produkcją ATP.

Akumulacja lipidów w wątrobie, głównie pod postacią trójglicerydów, prowadzi do rozwoju niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD, ang. *nonalcoholic fatty liver disease*), z progresją zmian morfologicznych wątroby, takich jak zapalenie wątroby (NASH, ang. *nonalcoholic*

*steatohepatitis*), marskość wątroby, a nawet pierwotny raka wątroby. W hepatocytach chorych na NAFLD stwierdzano zaburzenia homeostazy ATP oraz obniżoną aktywność enzymatyczną wszystkich pięciu kompleksów łańcucha oddechowego, czemu towarzyszy nasilenie produkcji ROS. Z kolei wolne rodniki mogą bezpośrednio uszkadzać kompleksy białkowe łańcucha oddechowego oraz powodować mutacje mtDNA. Wyniki badań własnych wykazały znamienne niższą ekspresję *hnRNPK* w wątrobie chorych z NASH niż u chorych z NAFLD, natomiast ekspresja *UCP2* była wyższa w wątrobie chorych z NASH niż z NAFLD [52].

Białko *UCP2* należy do rodziny przekaźników błonowych, zlokalizowanych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i uczestniczy w kontroli procesu powstawania ROS w mt. Badania na myszach pozbawionych genu *UCP2* wykazały podwyższoną produkcję wolnych rodników. Z kolei w wątrobie myszy z uwarunkowaną genetycznie otyłością obserwowano zwiększone ilości *UCP2* w hepatocytach, czemu towarzyszył spadek rezerwy ATP. Białko K wykazuje powinowactwo do transkryptu *UCP2*, poprzez wiązanie 3'-UTR mRNA i reguluje jego insulino-zależną ekspresję [53]. Jeżeli zatem białko K odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji genów ważnych dla utrzymania prawidłowych czynności mt, a mitochondrialne dysfunkcje są powiązane z rozwojem chorób metabolicznych, zaburzenia funkcji białka K mogą uczestniczyć w rozwoju otyłości i cukrzycy typu 2.

## Piśmiennictwo:

- Han SP, Tang YH, Smith R: Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J*, 2010; 430: 379–92
- Taylor SJ, Shalloway D: An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature*, 1994; 368: 867–71
- Bomsztyk K, Denisenko O, Ostrowski J: hnRNP K: one protein multiple processes. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 2004; 26: 629–38
- Mikula M, Ostrowski J: Human hnRNPK | TFe. *Transcription Factor Encyclopedia*. 2010 [cytowany 2010.11.27]. Dostępny pod adresem <http://burgundy.cmm.ubc.ca/cgi-bin/tfe/articles.pl?tfid=551>
- Mikula M, Gaj P, Dzwonek K i wsp.: Comprehensive Analysis of the Palindromic Motif TCTCGCGAGA: A Regulatory Element of the HNRNPK Promoter. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 2010; 17(4): 245–60
- Siomi H, Matunis MJ, Michael WM i wsp.: The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res*, 1993; 21: 1193–98
- Charroux B, Angelats C, Fasano L i wsp.: The Levels of the bancal Product, a Drosophila Homologue of Vertebrate hnRNP K Protein, Affect Cell Proliferation and Apoptosis in Imaginal Disc Cells. *Mol. Cell Biol*, 1999; 19: 7846–56
- Burd CG, Dreyfuss G: Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science*, 1994; 265: 615–21
- Siomi H, Matunis MJ, Michael WM i wsp.: The pre-mRNA binding protein contains a novel evolutionary conserved motif. *Nucleic Acid Res*, 1993; 21: 1193–98
- Makeyev AV, Liebhaber S.A: Identification of two novel mammalian genes establishes a subfamily of KH-domain RNA-binding proteins. *Genomics*, 2000; 67: 301–16
- Denisenko ON, Bomsztyk K: Yeast hnRNP K-Like Genes Are Involved in Regulation of the Telomeric Position Effect and Telomere Length. *Mol. Cell Biol*, 2002; 22: 286–97
- Thisted T, Lyakhov DL, Liebhaber SA: Optimized RNA Targets of Two Closely Related Triple KH Domain Proteins, Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K and CP-2KL, Suggest Distinct Modes of RNA Recognition. *J Biol Chem*, 2001; 276: 17484–96
- Klimek-Tomczak K, Wyrwicz LS, Sanjeev J i wsp.: Characterization of hnRNP K protein-RNA interactions. *Journal of Molecular Biology*, 2004; 342: 1131–41



14. Paziewska A, Wyrwicz LS, Bujnicki JM i wsp.: Cooperative binding of the hnRNP K three KH domains to mRNA targets. *FEBS Lett*, 2004; 577: 134–40
15. Paziewska A, Wyrwicz LS, Ostrowski J: The binding activity of yeast RNAs to yeast Hek2p and mammalian hnRNP K proteins, determined using the three-hybrid system. *Cell Mol Biol Lett*, 2005; 10: 227–35
16. Ostrowski J, Wyrwicz L, Rychlewski L i wsp.: The hnRNP K protein associates with multiple mitochondrial transcripts within the organelle. *J Biol Chem*, 2002; 277: 6303–10
17. Van Seuning I, Ostrowski J, Bustelo X i wsp.: The K protein domain that recruits the IL-1-responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster of Src- and Vav-SH3-binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform. *J Biol Chem*, 1995; 270: 26976–85
18. Bomsztyk K, Van Seuning I, Suzuki H i wsp.: Diverse molecular interactions of the hnRNP k protein. *FEBS Lett*, 1997; 403: 113–15
19. Mikula M, Dzwonek A, Karczmarski J i wsp.: Landscape of the hnRNP K protein-protein interactome. *Proteomics*, 2006; 6: 2395–406
20. Mikula M, Karczmarski J, Dzwonek A i wsp.: Casein kinases phosphorylate multiple residues spanning the entire hnRNP K length. *Biochim Biophys Acta*, 2006; 1764: 299–306
21. Ostrowski J, Schullery D, Denisenko ON i wsp.: Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of the interaction of hnRNP K protein with its protein and RNA partners. *J Biol Chem*, 2000; 275: 3619–28
22. Ostrowski J, Kawata Y, Schullery DS i wsp.: Insulin alters heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein binding to DNA and RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 9044–49
23. Mikula M: 2010. Praca przygotowywana do publikacji.
24. Ostrowski J, Kawata Y, Schullery DS i wsp.: Transient recruitment of the hnRNP K protein to inducibly transcribed gene *loci*. *Nucleic Acid Res*, 2003; 31: 1–9
25. Mikula M, Ostrowski J: 2010. Praca przygotowywana do publikacji
26. Li H, Jingwen L: Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K as a transactivator for human low density lipoprotein receptor gene transcription. *J Biol Chem*, 2010; 285: 17789–97
27. Denisenko ON, Bomsztyk K: Yeast hnRNP K-Like Genes Are Involved in Regulation of the Telomeric Position Effect and Telomere Length. *Mol Cell Biol*, 2002; 22: 286–97
28. Shnyreva M, Schullery DS, Suzuki H i wsp.: Interaction of two multifunctional proteins. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and Y-box-binding protein. *J Biol Chem*, 2000; 275: 15498–503
29. Wang ET, Sandberg R, Luo S i wsp.: Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*, 2008; 456: 470–76
30. Venables JP, Koh C-S, Froehlich U i wsp.: Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins. *Mol Cell Biol*, 2008; 28: 6033–43
31. Revil T, Pelletier J, Toutant J i wsp.: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of proapoptotic Bcl-xS splice isoform. *J Biol Chem*, 2009; 284: 21458–67
32. White MC, Gao R, Xu W i wsp.: Inactivation of hnRNP K by expanded intronic AUUCU repeat induces apoptosis via translocation of PKCdelta to mitochondria in spinocerebellar ataxia 10. *PLoS Genetics*, 2010; 6: e1000984
33. Mukhopadhyay NK, Kim J, Cinar B i wsp.: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a novel regulator of androgen receptor translation. *Cancer Res*, 2009; 69: 2210–18
34. Lee PT, Liao PC, Chang WC i wsp.: EGF increases the interaction between nucleolin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K/poly(C) binding protein1 complex to regulate the gastrin mRNA turnover. *Mol Biol Cell*, 2007; 18: 5004–13
35. Chen LC, Hsueh C, Tsang NM i wsp.: Heterogeneous ribonucleoprotein k and thymidine phosphorylase are independent prognostic and therapeutic markers for nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2008; 14: 3807–13
36. Kimura Y, Nagata K, Suzuki N i wsp.: Characterization of multiple alternative forms of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by phosphate-affinity electrophoresis. *Proteomics*, 2010; 10: 3884–95
37. Dejgaard K, Leffers H, Rasmussen HH i wsp.: Identification, molecular cloning, expression and chromosome mapping of a family of transformation upregulated hnRNP-K proteins derived by alternative splicing. *J Mol Biol*, 1994; 236: 33–48
38. Ostrowski J, Bomsztyk K: Nuclear shift of hnRNP K protein in neoplasms and other states of enhanced cell proliferation. *Br J Cancer*, 2003; 89: 1493–501
39. Moumen A, Masterson P, O'Connor MJ i wsp.: hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell*, 2005; 123: 1065–78
40. Maite H, Guttman M, Feldser D i wsp.: A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*, 2010; 142: 409–19
41. Carpenter B, McKay M, Dundas SR i wsp.: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2006; 95: 921–27
42. Barboro P, Repaci E, Rubagotti A i wsp.: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K: altered pattern of expression associated with diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Br J Cancer*, 2009; 100: 1608–16
43. Roychoudhury P, Chaudhuri K: Evidence for heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K overexpression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 2007; 97: 574–75
44. Pino I, Pío R, Toledo G i wsp.: Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. *Lung Cancer*, 2003; 41: 131–43
45. Wen F, Shen A, Shanas R i wsp.: Higher expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein k in melanoma. *Ann Surg Oncol*, 2010; 17: 2619–27
46. Klimek-Tomczak K, Mikula M, Dzwonek A i wsp.: Editing of hnRNP K protein mRNA in colorectal adenocarcinoma and surrounding mucosa. *Br J Cancer*, 2006; 94: 586–92
47. Mikula M, Rubel T, Karczmarski J i wsp.: Integrating proteomic and transcriptomic high-throughput surveys for search of new biomarkers of colon tumors. *Funct Integr Genomics*, 2010; [E-pub ahead of print]
48. de Hoog CL, Foster LJ, Mann M: RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell*, 2004; 117: 649–62

49. Inoue A, Sawata SY, Taira K i wsp.: Loss-of-function screening by randomized intracellular antibodies: identification of hnRNP-K as a potential target for metastasis. *Proc Nat Acad Scien USA*, 2007; 104: 8983–88
50. Dzwonek A, Mikula M, Ostrowski J: The diverse involvement of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in mitochondrial response to insulin. *FEBS Lett*, 2006; 580: 1839–45. *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*
51. Ostrowski J, Kawata Y, Schullery DS i wsp.: Insulin alters heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein binding to DNA and RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001; 98: 9044–49
52. Bragoszewski P, Habior A, Walewska-Zielecka B i wsp.: Expression of genes encoding mitochondrial proteins can distinguish nonalcoholic steatosis from steatohepatitis. *Acta Biochim Pol*, 2007; 54: 341–48
53. Ostrowski J, Klimek-Tomczak K, Wyrwicz LS i wsp.: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K enhances insulin-induced expression of mitochondrial UCP2 protein. *J Biol Chem*, 2004; 279: 54599–609

# Synteza i badania biologiczne pochodnych cukrowych i aminocukrowych indolo[2,3-B]chinoliny

## Synthesis and biological screening of glycoside and aminoglycoside derivatives of indolo[2,3-b]quinoline

Łukasz Kaczmarek<sup>1</sup>,  
Katarzyna  
Badowska-Rostonek<sup>1</sup>,  
Wanda Peczyńska-Czoch<sup>2</sup>,  
Joanna Godlewska<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Instytut Farmaceutyczny, Warszawa

<sup>2</sup> Politechnika Wrocławska, Instytut Chemii Organicznej i Biotechnologii, Wrocław

<sup>3</sup> Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2002 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem prof. Łukasza Kaczmarka grant na realizację projektu badawczego pt. *Synteza i badania biologiczne pochodnych cukrowych i aminocukrowych indolo[2,3-b] chinoliny*.

### Streszczenie

W celu poprawy biodostępności indolochinolin o właściwościach cytotoksycznych zaproponowano syntezę związków hybrydowych, złożonych z interkalującej części indolochinolinowej i elastycznego łańcucha bocznego, połączonego wiązaniem glikozydowym z fragmentem cukrowym lub aminocukrowym. Wyjściowe hydroksyindolochinoliny, otrzymane przez deeterifikację 2- i 9-metoksypochodnych, alkilowano za pomocą octanów 2-bromoetylu i 5-bromopentylu, następnie deacetylowano i uzyskane alkohole glikozydowano metodą *Mioskowskiego* przez przyłączenie do odpowiednio zabezpieczonych glikali. Po odbezpieczeniu grup funkcyjnych w przyłączonych fragmentach cukrowych i aminocukrowych uzyskano 27 docelowych związków, które poddano ocenie biologicznej, obejmującej ocenę aktywności cytotoksycznej *in vitro* na komórkach ludzkiego raka KB, specyficzności hamowania faz cyklu komórkowego i hamowania aktywności topoizomerazy II. Dla niektórych związków (szczególnie posiadających podstawniki aminocukrowe), osiągnięto wysoką aktywność cytotoksyczną, specyficzność hamowania cyklu komórkowego w fazie G<sub>2</sub>M i zahamowanie działania topoizomerazy II w stopniu znacznie przewyższającym takie związki referencyjne, jak m-AMSA lub daunomycyna.

**Słowa kluczowe:** indolochinoliny • cukry • związki hybrydowe • cytotoksyczność • topoizomeraza II

### Summary

The synthesis of hybrid compounds, consisting of indoloquinoline intercalator and an elastic chain connected by glycoside bond to the carbohydrate or aminocarbohydrate moiety, in order to improve a bioavailability of cytotoxic indoloquinolines, was proposed. The starting hydroxyindoloquinolines, obtained by de-etherification of 2- and 9-methoxyderivatives, were alkylated with 2-bromoethyl and 5-bromophenyl acetates, then deacetylated and the alcohols formed were glycosylated by *Mioskowski's* method by addition to the protected glycals. Final compounds (27), obtained after deprotection of functional groups in carbohydrate or aminocarbohydrate moieties, were screened for their cytotoxic activity on human cancer KB cells. The specificity of cell-cycle and topoisomerase II activity inhibitions were also tested. Some compounds (particularly containing aminosugar moiety) show high cytotoxicity and specific cell cycle phase G<sub>2</sub>M inhibition. These compounds act as more potent topoisomerase II inhibitors, than reference m-AMSA and daunomycin.

**Key words:** indoloquinolines • carbohydrates • hybrid compounds • cytotoxicity • topoisomerase II

Wpłynęło: 10-11-2010  
Zaakceptowano: 08-12-2010  
Opublikowano: 30-03-2011

**Adres do korespondencji:**  
prof. dr hab. Łukasz  
Kaczmarek, Instytut  
Farmaceutyczny,  
ul. Rydygiera 8,  
01-793 Warszawa,  
e-mail: l.kaczmarek@ifarm.eu

## WSTĘP

Choroby nowotworowe, ich leczenie i profilaktyka stanowią jeden z najtrudniejszych problemów i największych wyzwań dla medycyny początku XXI wieku. Znaczący wzrost zachorowalności na nowotwory, szczególnie w krajach uprzemysłowionych, jest dodatkowym bodźcem do poszukiwań nowych sposobów zwalczania chorób nowotworowych, w tym także w obszarze farmakoterapii, która w odniesieniu do tych chorób obejmuje chemo- i hormonoterapię [1].

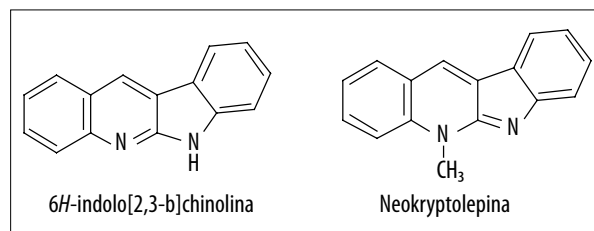
Przedmiotem licznych programów projektowania leku przeciwnowotworowego jest poszukiwanie cząsteczek zdolnych do penetracji komórek zmienionych nowotworowo i do specyficznego wiązania z określonymi sekwencjami kwasów nukleinowych, zaangażowanych lub bezpośrednio odpowiedzialnych za określoną patologię [2]. Istnieją dwa główne sposoby, w jaki wiązanie z kwasami nukleinowymi może być osiągnięte. Pierwszy z nich zakłada wiązanie DNA lub RNA poprzez oligonukleotydy tworzące potrójne helisy [3,4] oraz analogi antysensownych nukleotydów [5,6]. W drugim podejściu bierze się pod uwagę użycie biologicznie aktywnych cząsteczek o małym ciężarze cząsteczkowym, w większości pochodzenia naturalnego, które wiążą się z DNA w sposób mniej lub bardziej selektywny. Z powodu ogromnej różnorodności strukturalnej i nie mniejszej zmienności właściwości biologicznych tych związków, stanowią one od lat przedmiot ogromnego zainteresowania badaczy.

Projektowanie nowych ligandów wiążących DNA wymaga rozważenia interakcji nie tylko z DNA, ale również z powiązаныmi czynnikami komórkowymi. Właściwości farmakologiczne wielu przeciwnowotworowych cząsteczek są bowiem prawdopodobnie pochodną wielu innych czynników, takich jak hamowanie enzymów replikacyjnych oraz naprawczych DNA, generowanie wolnych rodników, czy też wiązanie z membranami. Szczególną rolę odgrywają tu enzymy należące do systemu naprawy DNA, czyli topoiizomerazy [7], które uczestniczą w większości procesów przebiegających z udziałem DNA [8,9]. Wynika stąd ogromna rola topoiizomeraz w szybko proliferujących komórkach nowotworowych, a co za tym idzie ich stężenie w tych komórkach okazuje się być wyjątkowo wysokie. Przyczynia się to do faktu, że wiele klinicznie użytecznych leków przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych atakuje właśnie te enzymy [10–12]. Poszukiwanie leku, który połączy selektywne oddziaływanie z DNA oraz interakcję z topoiizomerazami jest jednym z obiecujących kierunków prac nad nowoczesnym chemoterapeutykami [2,13].

Wydaje się, że najbardziej efektywnym modelem potencjalnego związku cytotoksycznego o takim działaniu jest cząsteczka złożona z dwóch domen, a mianowicie części interkalującej i zaburzającej działanie topoiizomeraz (np. płaski aromatyczny układ policykliczny o odpowiedniej budowie) oraz części oddziałującej z bruzdą helisy DNA jako układ rozpoznający sekwencję DNA (np. elastyczny łańcuch zawierający heteroatomy) [2].

Przykładem cytostatyków o takiej właśnie budowie są antybiotyki antracyklinowe, znane od ponad 30 lat i z powodzeniem stosowane (jak np. doksorubicyna) w praktyce klinicznej, jako leki przeciwnowotworowe. O ich aktywności decyduje nie tylko obecność w cząsteczce płaskiego układu policyklicznego, ale również części aminocukrowej, o określonej konfiguracji. Wykazano, że udział części cukrowej w całkowitej energii wiązania kompleksu antybiotyku antracyklinowego z DNA wynosi około 40% [14] i nie jest tylko efektem oddziaływań protonowej grupy aminowej aminocukru z ujemnie naładowanymi resztami grup fosforanowych oligonukleotydu. Nie bez znaczenia dla aktywności *in vivo* tych związków jest również ogromny wpływ części węglowodanowej na charakterystykę farmakokinetyczną i biodostępność [15,16].

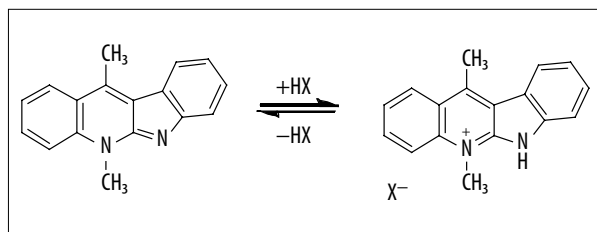
Inną grupę związków wykazujących znaczną aktywność *in vitro* jako inhibitory topoiizomeraz i efektywne interkalatory DNA stanowią pochodne indolochinolin [17,18]. Układ ten został po raz pierwszy otrzymany przez Gabriela i Eschenbacha w 1897 r. [19], a pierwszą użyteczną syntezę indolochinoliny przeprowadził Robinson w 1905 r. [20]. Okazało się także, że układ indolochinoliny występuje w przyrodzie jako alkaloid indolowy neokryptolepina (kryptotakieina) odkryty w 1996 r. w wyciągu z korzeni rośliny *Cryptolepis sanguinolenta* [21] (Rycina 1).



Rycina 1.

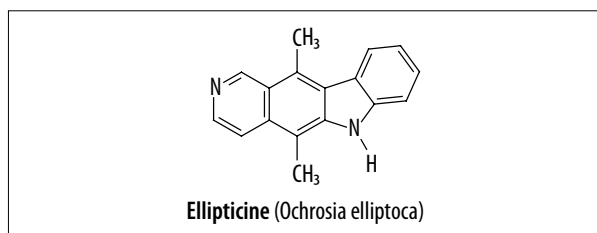
W trakcie prowadzonych wcześniej poszukiwań nowych związków o działaniu przeciwnowotworowym wśród azotowych połączeń heterocyklicznych zwróciliśmy uwagę na benzopochodne indolu, jako potencjalne interkalatory DNA. Staranne badania zależności struktura-aktywność i biotransformacji otrzymanych związków pozwoliły na

wyselekcjonowanie oryginalnego cytostatyku w postaci pochodnych 5,11-dimetylo-5H-indolo[2,3-b]chinoliny (Rycina 2) [18,22]:



Rycina 2.

Związek ten z jednej strony jest analogiem naturalnej występującej neokryptolepiny, a z drugiej przypomina alkaloid eliptycyne, połączenie o właściwościach cytotoksycznych i przeciwnowotworowych [23] (Rycina 3.), o ile jednak synteza eliptycyny jest trudna i kosztowna, o tyle indolochinoliny otrzymuje się w sposób stosunkowo prosty i z tanich, łatwo dostępnych surowców.

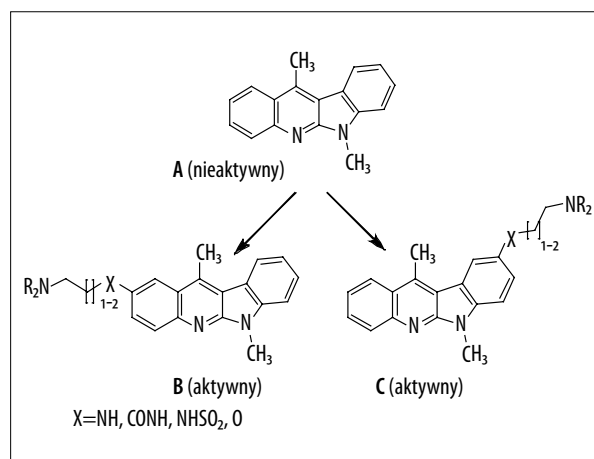


Rycina 3.

Otrzymana 5,11-dimetylo-5H-indolo[2,3-b]chinolina wykazuje znamienne właściwości cytotoksyczne *in vitro* i przeciwnowotworowe *in vivo* w stosunku do mysich białaczek L1210 i P388 oraz czerniaka B16 [17]. Jak wykazały dalsze badania, indolochinoliny są interkalatorami DNA oraz tworzą kompleks lek-DNA-topoizomeraza II, blokujący działanie topoizomerazy, a w konsekwencji prowadzący do rozerwania nici DNA i śmierci komórki [18,22]. Poważną wadą pochodnych indolochinoliny przedstawionej na Rycinie 2 jest jednak niewielka selektywność działania na cykl komórkowy nowotworów oraz zła biodostępność objawiona w niskiej aktywności przeciwnowotworowej *in vivo* i w upośledzonej wchłanianości w organizmie (badania niepublikowane).

## CEL I OPIS PROJEKTU

W świetle danych literaturowych i dotychczasowych własnych doświadczeń przyjęto założenie, że modyfikacje polegające na wprowadzeniu podstawników o odpowiedniej budowie do układu indolo[2,3-b]chinoliny powinny doprowadzić do uzyskania struktur, w których stosunek oddziaływań pomiędzy DNA, interkalującym chromoforem

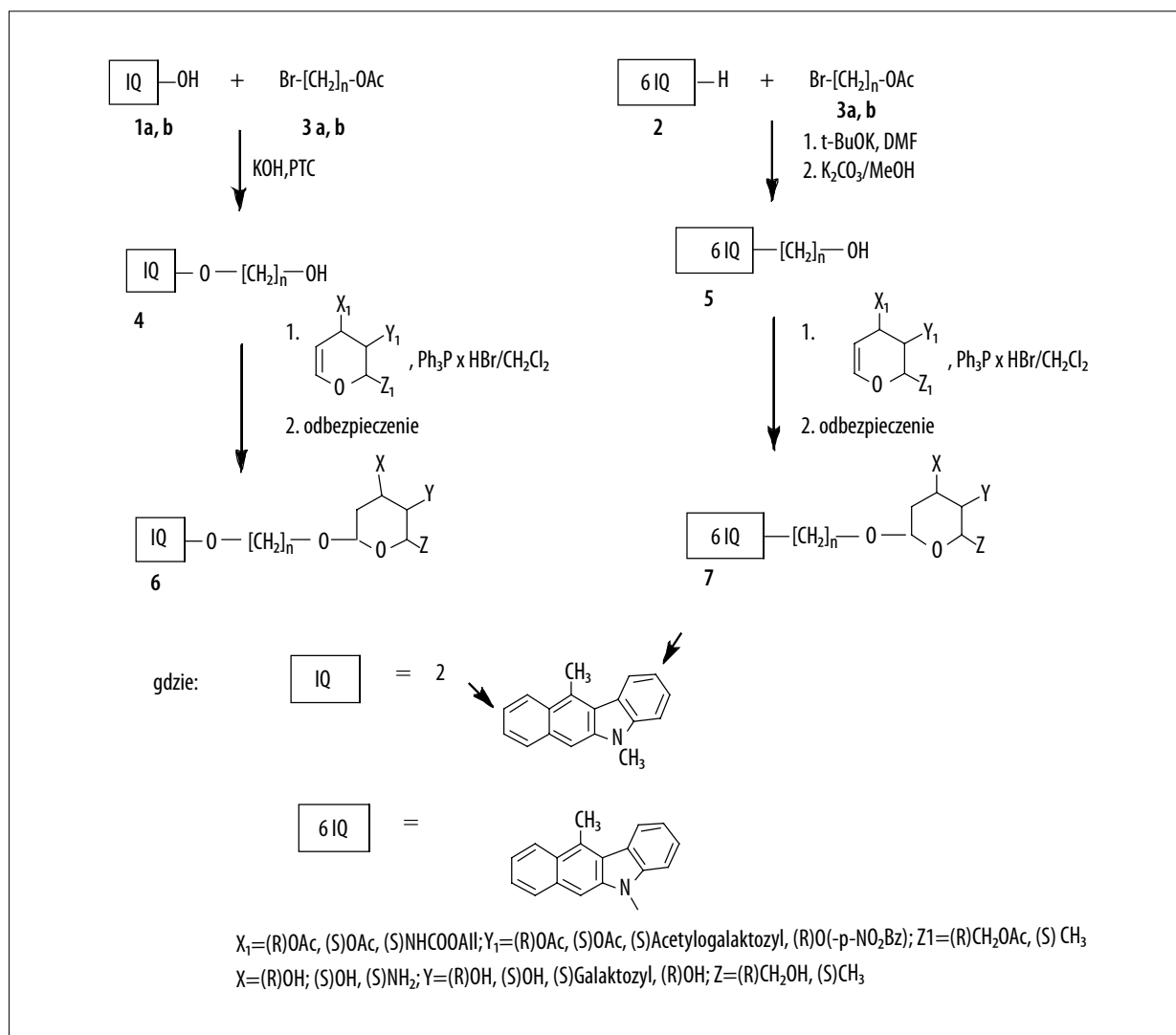


Rycina 4.

i łańcuchem bocznym będzie odpowiedni do osiągnięcia regioselektywnego wiązania do polinukleotydu. Efekt ten powinien znaleźć odzwierciedlenie w zwiększeniu cytotoksyczności i selektywności działania w stosunku do komórek nowotworowych (także wykazujących oporność wielolekową) i osiągnięciu korzystnego indeksu terapeutycznego przez nowe związki hybrydowe.

W celu poprawy właściwości biologicznych indolochinolin zaproponowano syntezę związków hybrydowych, złożonych z interkalującej części indolochinolinowej i elastycznego łańcucha bocznego, połączonego poprzez wiązanie glikozydowe z fragmentem cukrowym lub aminocukrowym. Pozytywny wpływ podstawników węglowodanowych na rozpuszczalność w wodzie, a co za tym idzie również na biodostępność, nie ulegał wątpliwości. Przez analogię do antybiotyków antracyklinowych można się było również spodziewać korzystnego efektu odpowiednio dobranego podstawnika cukrowego na zdolność całego związku do tworzenia specyficznych kompleksów z DNA i topoizomerazą. Zgodnie z oczekiwaniami cząsteczki te powinny były wykazywać wyższą aktywność cytotoksyczną i zwiększoną selektywność działania.

Wstępna weryfikacja hipotezy odnoszącej się do wpływu odpowiednio dobranych podstawników na aktywność pochodnych indolochinoliny przeprowadzona została wcześniej przez syntezę szeregu związków złożonych z alkilowego łańcucha zawierającego heteroatomy i układu indolochinolinowego zawierającej podstawnik metylowy na indolowym atomie azotu (A). 6-Metylo pochodną indolochinoliny A wybrano celowo jako składnik projektowanej hybrydy, bowiem – jak to zbadano wcześniej – jest ona praktycznie pozbawiona aktywności. Uzyskanie związków aktywnych w grupie hybryd zawierających układ 6-metyloindolochinolinowy potwierdzałyby założenie, że wprowadzenie do



Rycina 5.

układu indolochinoliny podstawników modyfikuje aktywność cytotoksyczną w sposób istotny. Rzeczywiście, badania *in vitro* wykazały znaczny wzrost aktywności cytotoksycznej pochodnych **B** i **C** (Rycina 4) w porównaniu ze związkami wyjściowymi i wzrost specyficzności wyrażonej hamowaniem określonej fazy podziału komórek nowotworowych. Co więcej, uzyskano szereg danych dotyczących zależności między strukturą i umiejscowieniem łańcucha w cząsteczce, a aktywnością pochodnej [24].

W oparciu o uzyskane dane zaprojektowano serię pochodnych 6*H*-indolo[2,3-*b*]chinoliny i jej 6-metylowego analogu, zawierających w pozycjach 2- lub 9-łańcuchy alkoxyalkilowe albo w pozycji 6-łańcuchy alkilowe o zróżnicowanej długości, połączone wiązaniem glikozydowym z ugrupowaniami cukrowymi (D-glukozą, L-ramnozą, D-laktozą) i aminocukrowymi (L-akozaminą i L-daunozaminą, cukrami obecnymi w antybiotykach antracyklinowych). Wyjściowe hydroksy-indolochinoliny **I** otrzymano przez deacetyfikację odpowiednich

2- lub 9- metoksypochodnych. Związki **I** oraz indolochinolina **2** były następnie alkilowane z użyciem octanów 2-bromoetylu i 5-bromopentylu (**3a, 3b**), deacetylowane, a uzyskane alkohole **4** i **5** glikozydowane metodą *Mioskowskiego* przez przyłączenie wolnej grupy hydroksylowej do odpowiednio zabezpieczonych glikali (cukrów 1,2-nienasyconych) w obecności bromowodoru trifenylfosfory, jako katalizatora kwasowego. Po odbezpieczeniu grup hydroksylowych w przyłączonych cukrach uzyskano 27 docelowych preparatów o ogólnym wzorze **6, 7** (Rycina 5), które przekazano do oceny biologicznej.

## WYNIKI PROJEKTU

Otrzymane związki badano z punktu widzenia aktywności cytotoksycznej *in vitro* na komórkach ludzkiego raka KB, specyficzności hamowania faz cyklu komórkowego i hamowania aktywności topoisomazy II. Wyniki były mocno zróżnicowane, jednak dla niektórych związków (szczególnie posiadających podstawniki aminocukrowe), osiągnięto

wysoką aktywność cytotoksyczną, specyficzną hamowania cyklu komórkowego w fazie G<sub>2</sub>M i zahamowanie działania topoizomerazy II w stopniu znacznie przewyższającym takie związki referencyjne, jak m-AMSA lub daunomycyna. Z uzyskanych danych wynika, że wprowadzenie do nieaktywnej cząsteczki 6H-indolochinoliny podstawnika aminocukrowego pozwala uzyskać silny inhibitor topoizomerazy II, o wysokiej aktywności cytotoksycznej, hamujący rozwój komórek nowotworowych w określonej fazie, a ponadto istnieją tu bardzo wyraźne związki między modyfikacjami struktury, a mechanizmem działania nowych połączeń. Uzyskane wyniki były przedmiotem dwóch rozpraw doktorskich [25,26], dwóch publikacji [27,28] i zgłoszenia patentowego [29]. Prace, będące przedmiotem projektu, stały się podstawą do dalszych badań obejmujących syntezę analogów zawierających układ 5-metylo-5H-indolo[2,3-b]chinoliny, które wykazały wysoką aktywność cytotoksyczną *in*

*vitro*, natomiast odznaczały się także wysoką toksycznością ogólną w badaniach *in vivo*. Badania te są przedmiotem pracy magisterskiej [30], publikacji [31], artykułu przeglądowego [32] i zgłoszenia patentowego [33]. Ostatnio prowadzone badania nad indolochinolinami, jako potencjalnymi cytostatykami, których korzenie sięgają omówionego wyżej projektu, są prace nad pochodnymi aminokwasowymi i peptydowymi. Są one przedmiotem kolejnej rozprawy doktorskiej [34], publikacji [35] i zgłoszenia patentowego [36]. Najważniejszy osiągnięciem jest jednak uzyskanie pierwszych hybrydowych pochodnych indolochinolin, które wykazują silne działanie przeciwnowotworowe *in vivo*, przy umiarkowanej toksyczności ogólnej.

#### PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Panu dr Janowi Ramzie za udział w dyskusjach dotyczących realizacji projektu.

#### Piśmiennictwo:

1. Zejc A, Gorczyca M (red.), *Chemia Leków*, Warszawa, PZWL, 2004
2. Bailly Ch, Henichart J-P: Molecular pharmacology of intercalator – groove binder hybrid molecules. W: *Anticancer Drug-DNA Interactions*. London: The Macmillan Press 1994; 2: 162–66
3. Moser HE, Dervan PB: Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. *Science*, 1987; 238: 645–50
4. Cooney M, Czernuszewicz G, Postel EH et al: Site-specific oligonucleotide binding represses transcription of the human c-myc gene *in vitro*. *Science*, 1988; 241: 456–59
5. Sun JS, Francois JC, Lavery R et al: Sequence-targeted cleavage of nucleic acids by oligo-[ $\alpha$ ]thymidylate-phenanthroline conjugates: parallel and antiparallel double helices are formed with DNA and RNA, respectively. *Biochemistry*, 1988; 27: 6039–45
6. Van der Krol AR, Mol JNM, Stuitje AR: Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biotechniques*, 1988; 6: 958–75
7. Sobel HM: DNA dynamics and drug interaction. W: *Molecular Actions and Targets for Cancer Chemotherapeutic Agents*, New York: Academic Press, 1981; 119–35
8. Wang JC: DNA topoisomerases. *Ann Rev Biochem*, 1985; 54: 665–97
9. Wang JC: Recent studies of DNA topoisomerases. *Biochim Biophys Acta*, 1987; 909: 1–9
10. Drlica K, Franco RL: Inhibitors of DNA topoisomerases. *Biochemistry*, 1988; 27: 2253–59
11. Kreuzer KN: DNA topoisomerases as potential targets of antiviral action. *Pharmacol Ther*, 1989; 43: 377–95
12. Liu LF: DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. *Ann Rev Biochem*, 1989; 58: 351–75
13. Palumbo M, Gatto B, Moro S et al: Sequence-specific interactions of drugs interfering with the topoisomerase-DNA cleavage complex. *Biochim Biophys Acta*, 2002; 1587: 145–54
14. Chaires JB, Satyanarayana S, Suh D i wsp.: Parsing the free energy of anthracycline antibiotic binding to DNA. *Biochemistry*, 1996; 35: 2047–53
15. Priebe W, Witczak Z: Anthracycline antibiotics: From the bench to the clinic. *Materiały z III Międzynarodowego Sympozjum na Temat Antybiotyków Antracyklinowych*, 1999, Anaheim Ca. USA: *Curr Med Chem*, 2001; 8: 1
16. Priebe W, Perez-Soler R: Design and tumor targeting of anthracyclines able to overcome multidrug resistance: a double-advantage approach. *Pharmacology and Therapeutics*, 1993; 60(2): 215–34
17. Kaczmarek Ł, Balicki R, Nantka-Namirski P et al: Cancerostatics VI. Synthesis and antineoplastic properties of some benzo-iso- $\alpha$ -carboline. *Arch Pharm (Weinheim)*, 1988; 321: 463–67
18. Pognan F, Saucier J-M, Paoletti C i wsp.: A carboline derivative as a novel mammalian DNA-topoisomerase II targeting agent. *Biochem Pharm*, 1992; 44: 2149–55
19. Gabriel S, Eschenbach G: Ueber Derivate von Nitro- $\alpha$ -zimtsaeuren. *Ber*, 1897; 30: 3019–33
20. Lawson W, Perkin WH, Robinson R: Harmine and harmaline. *J Chem Soc*, 1924; 126: 626–57
21. Cimanga K, DeBruyne T, Pieters L i wsp.: New alkaloids from *Cryptolepis Sanguinolenta*. *Tetrahedron Letters*, 1996; 379(101): 703–6
22. Peczyńska-Czoch W, Pognan F, Kaczmarek Ł i wsp.: Synthesis and structure-activity relationship of methyl-substituted indolo[2,3-b]quinolines: novel cytotoxic, DNA topoisomerase II inhibitors. *J Med Chem*, 1994; 37: 3503–10
23. Auclair C: Multimodal action of antitumor agents on DNA: The Ellipticine series. *Arch Biochem Biophys*, 1987; 259/1: 1–14

24. Godlewska J, Łuniewski W, Zagrodzki B i wsp.: Biological evaluation of  $\omega$ -(dialkylamino)alkyl derivatives of 6H-indolo[2,3-b]quinoline – novel cytotoxic DNA topoisomerase II inhibitors *Anticancer Res*, 2005; 25: 2857–68
25. Badowska-Rosłonek K: Synteza pochodnych cukrowych i aminocukrowych indolo[2,3-b]chinolin o spodziewanym działaniu cytotoksycznym. Rozprawa doktorska, Akademia Medyczna w Warszawie, Warszawa, 2004. *Praca zawiera wyniki badań realizowanych dzięki grantowi Naukowej Fundacji Polpharmy*
26. Godlewska J: Pochodne indolo[2,3-b]chinoliny jako nowa grupa cytostatyków i inhibitorów topoizomerazy II. Rozprawa doktorska, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Wrocław, 2004. *Praca zawiera wyniki badań realizowanych dzięki grantowi Naukowej Fundacji Polpharmy*
27. Godlewska J, Badowska-Rosłonek K, Ramza J i wsp.: New saccharide derivatives of indolo[2,3-b]quinoline as cytotoxic compounds and topoisomerase II inhibitors. *Radiol Oncol*, 2004; 38(2): 137–44. *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*
28. Badowska-Rosłonek K, Kaczmarek Ł, Ramza J i wsp.: New glycoside derivatives of 6H-indolo[2,3-b]quinolines. *Pol J Chem*, 2005; 79: 369–86. *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*
29. Kaczmarek Ł, Ramza J, Badowska-Rosłonek K i wsp.: Węglowodanowe pochodne indolo[2,3-b]chinoliny i sposób ich otrzymywania. Zgł. Pat. P-353 811 (10.05.2002)
30. Bukowska A: Synteza cukrowych pochodnych indolochinoliny o spodziewanym efekcie cytotoksycznym. Praca magisterska, Politechnika Warszawska, Warszawa, 2004
31. Bednarek E, Bocian W, Sitkowski J i wsp.: <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data for indolo[2,3-b]-quinoline – aminoglycoside hybrids, a novel potent anticancer drug family. *Magn Res Chem*, 2006; 44: 459–62
32. Badowska-Rosłonek K, Łuniewski W, Ciesielska A i wsp.: Indolochinoliny – syntezy nowych analogów (art. przeglądowy). *Przemysł Chem*, 2006; 85/5: 314–20
33. Badowska-Rosłonek K, Kaczmarek Ł, Ramza J: Węglowodanowe pochodne 5,11-dimetylo-5H-indolo[2,3-b]chinoliny, sposób ich otrzymywania i zawierające je środki farmaceutyczne. 2004, Zgł. Pat. P-366 884 (02.04.2004)
34. Sidoryk K: Synteza nowych pochodnych aminokwasowych i peptydowych 5H- i 6H-indolo[2,3-b]chinolin o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym, Rozprawa doktorska, Akademia Medyczna w Warszawie, Warszawa, 2010
35. Sidoryk K, Kaczmarek Ł, Szczepek WJ i wsp.: New aminoacid derivatives of 6H-indolo[2,3-b]quinolines. *Pol J Chem*, 2008; 82: 2095–105
36. Sidoryk K, Kaczmarek Ł, Szczepek W i wsp.: Pochodne aminokwasowe 6,11-dimetylo-6H-indolo[2,3-b]chinoliny. 2008; P-385006



# Indukcja apoptozy w komórkach białaczek ludzkich MOLT4 i HL60 przez acyloksytriazoloakrydony – nową grupę związków o właściwościach przeciwnowotworowych

## Induction of apoptosis of human leukemia MOLT4 and HL60 cells by acyloksytriazoloacridinones – the new class of antitumor compounds

Ewa Augustin

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska, Gdańsk

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2002 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem dr Ewy Augustin grant na realizację projektu badawczego pt. *Badanie mechanizmu programowanej śmierci komórki (apoptozy) indukowanej przez triazoloakrydony – nową grupę związków o właściwościach przeciwnowotworowych.*

### Streszczenie

Acyloksytriazoloakrydony stanowią nową grupę pochodnych akrydonu, otrzymanych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, w wyniku modyfikacji cząsteczki triazoloakrydonu w pozycji 8. Podobnie jak triazoloakrydony, wykazują one silne działanie cytotoksyczne w stosunku do wielu linii komórek nowotworowych *in vitro* (białaczki, nowotwory lite). W niniejszej pracy, zrealizowanej w ramach projektu finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy wykazano, że acyloksytriazoloakrydony, podobnie jak triazoloakrydony, indukują apoptozę w komórkach białaczek ludzkich MOLT4 i HL60. Komórki obu linii ulegały apoptozie w wyniku traktowania acyloksytriazoloakrydonami w stężeniach związków biologicznie istotnych, odpowiadających wartościom  $EC_{80}$  i  $EC_{90}$ . Indukcję apoptozy przez acyloksytriazoloakrydony w komórkach MOLT4 i HL60 zbadano w oparciu o charakterystyczne zmiany morfologiczne jąder komórkowych (ciałka apoptotyczne), międzynukleosomalną fragmentację DNA, zmiany w budowie błony cytoplazmatycznej (translokacja fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony), spadek mitochondrialnego potencjału błonowego  $\Delta\Psi_m$  oraz aktywację kaspazy-3. Zdolność do indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych przez acyloksytriazoloakrydony pozwala uznać je za potencjalne i obiecujące związki o właściwościach przeciwnowotworowych.

**Słowa kluczowe:** acyloksytriazoloakrydony • apoptoza • białaczka ludzka MOLT4 i HL60 • kaspazy • mitochondria

Wpłynęło: 15-02-2011

Zaakceptowano: 15-02-2011

Opublikowano: 30-03-2011

---

### Adres do korespondencji:

dr Ewa Augustin, Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Technologii Leków i Biochemii, ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk, e-mail: ewa.augustin@pg.gda.pl

## Summary

Acyloksytriazoloacridinones are a new group of acridinone derivatives synthesized and developed at the Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry at Gdańsk University of Technology, by the modification of the triazoloacridinone at position 8. Like triazoloacridinones, they exhibit a strong cytotoxic activity against several tumor cell lines *in vitro* (leukemias, solid tumors). Studies carried out under the project funded by the Polpharma Scientific Foundation, demonstrated that acyloksytriazoloacridinones, like triazoloacridinones, induced apoptosis in human leukemia MOLT4 and HL60 cells. Cells of both lines underwent apoptosis following acyloksytriazoloacridinones treatment at biological relevant concentrations, corresponding to  $EC_{80}$  and  $EC_{90}$  values. Induction of apoptosis by acyloksytriazoloacridinones in MOLT4 and HL60 cells was examined on the basis of characteristic morphological changes of cells nuclei (the presence of apoptotic bodies), appearance of internucleosomal DNA fragmentation, changes in the structure of the plasma membrane (translocation of phosphatidylserine to the outer layer of membrane), decrease of the mitochondrial transmembrane potential  $\Delta\Psi_m$  and activation of caspase-3. The ability of acyloksytriazoloacridinones to induce apoptosis in tumor cells allows us to consider them as a potent and promising antitumor agents.

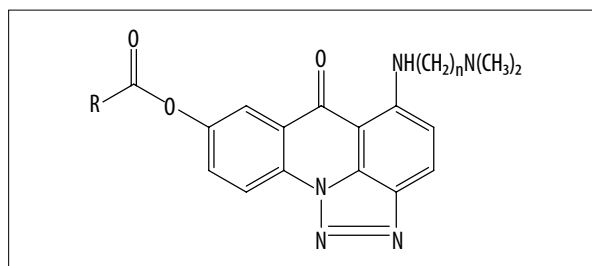
**Key words:** acyloksytriazoloacridinones • apoptosis • human leukemia MOLT4 and HL60 • caspases • mitochondria

## WSTĘP

Powstawanie nowotworów przez długi czas rozpatrywane było jako efekt niekontrolowanej proliferacji komórek, które uległy transformacji nowotworowej. Konsekwencją takiego podejścia było poszukiwanie związków i leków jedynie pod kątem ich właściwości antyproliferacyjnych. Obecnie zagadnienie powstawania i wzrostu nowotworów jest postrzegane jako zaburzenie równowagi pomiędzy tempem proliferacji, a śmiercią komórek, które uległy transformacji nowotworowej [1,2]. Progresja nowotworu i wzrost stopnia złośliwości zależą również od zmian w podatności komórek do ulegania spontanicznej śmierci – apoptozie. Stąd też poszukuje się związków i leków, które przywróciłyby komórkom nowotworowym zdolność do samoeliminacji, którą zatraciły w wyniku wyłamania się spod kontroli mechanizmów decydujących o ich podziałach i lokalizacji.

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej, w zespole kierowanym przez prof. Jerzego Konopę, od wielu lat prowadzi się badania nad poszukiwaniem związków o właściwościach przeciwnowotworowych wśród pochodnych akrydyny. Badania te doprowadziły m.in. do otrzymania pierwszego i jak dotąd jedynego, oryginalnego polskiego leku przeciwnowotworowego o nazwie Ledakrin (Nitracrine) [3]. Kolejną grupą związków przeciwnowotworowych otrzymanych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii były imidazoakrydony, spośród których najbardziej aktywna biologicznie

pochodna, związek o symbolu C-1311, dotarł do II fazy badań klinicznych na pacjentkach z przerzutowym rakiem piersi [4,5]. Triazoloakrydony stanowią następną grupę pochodnych akrydyny zsyntetyzowanych na Politechnice Gdańskiej [6]. Związki te są analogami strukturalnymi wspomnianych wyżej imidazoakrydonów. Triazoloakrydony wykazują wysoką aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek wielu linii nowotworowych *in vitro*, jak również silne działanie przeciwnowotworowe w stosunku do nowotworów ludzkich przeszczepialnych u myszy, zwłaszcza białaczek i raków jelita grubego [6,7]. Najbardziej aktywna pochodna z grupy triazoloakrydonów, związek o symbolu C-1305 został wytypowany do rozszerzonych badań przedklinicznych. Pochodna C-1305 jest inhibitorem topoizomerazy II [8], a po aktywacji metabolicznej indukuje powstawanie międzyłańcuchowych wiązań sieciujących w komórkach nowotworowych [9]. Na poziomie komórkowym, C-1305 blokuje cykl życiowy komórek



**Rycina 1.** Ogólna struktura chemiczna acyloksytriazoloakrydonów.

**Tabela 1.** Aktywność cytotoksyczna wybranych pochodnych acyloksytriazoloakrydonów wobec komórek białaczek ludzkich MOLT4 i HL60.

Związek	MOLT4		HL60	
	*EC50 [ $\mu$ M]	*EC90 [ $\mu$ M]	*EC50 [ $\mu$ M]	*EC80 [ $\mu$ M]
C-1742	(7,2 $\pm$ 0,3) $\cdot$ 10 <sup>-4</sup>	0,5 $\pm$ 0,114	0,03 $\pm$ 0,001	0,6 $\pm$ 0,126
C-1750	(6,6 $\pm$ 0,3) $\cdot$ 10 <sup>-4</sup>	0,5 $\pm$ 0,1	0,05 $\pm$ 0,003	0,5 $\pm$ 0,03
C-1764	(8,13 $\pm$ 0,23) $\cdot$ 10 <sup>-4</sup>	0,6 $\pm$ 0,113	0,074 $\pm$ 0,0015	0,7 $\pm$ 0,196
C-1779	(7,7 $\pm$ 0,2) $\cdot$ 10 <sup>-4</sup>	0,8 $\pm$ 0,193	0,03 $\pm$ 0,0012	0,5 $\pm$ 0,03

\* EC<sub>50</sub>, EC<sub>80</sub>, EC<sub>90</sub>: wartości stężeń związków hamujących proliferację komórek MOLT4 i HL60 odpowiednio w 50%, 80% i 90% w stosunku do komórek kontrolnych (nietraktowanych badanymi związkami). Wyniki są średnią z 3 niezależnych doświadczeń wraz z odchyleniami standardowymi.

białaczek ludzkich w fazie G2/M i w konsekwencji indukuje apoptozę tych komórek [10].

Ze względu na wysoką aktywność przeciwnowotworową i korzystne właściwości biologiczne triazoloakrydonów, podjęto próbę uzyskania nowych pochodnych tych związków o właściwościach potencjalnie korzystniejszych od wyjściowych. W wyniku modyfikacji chemicznej cząsteczki triazoloakrydonu w pozycji 8, otrzymano grupę biologicznie czynnych triazoloakrydonów II generacji – acyloksytriazoloakrydonów (Rycina 1). Związki te posiadają dwie grupy farmakoforowe, od których zależy ich aktywność przeciwnowotworowa (ugrupowanie diaminoalkilowe w łańcuchu bocznym oraz potencjalny układ chinoidowy tworzony przez grupy 8-OH i heterocykliczny atom azotu pierścienia akrydonu). Szereg pochodnych z tej grupy wykazuje wysoką aktywność cytotoksyczną wobec komórek białaczek ludzkich HL60, MOLT4 oraz raka jelita grubego HT29, jak również aktywność przeciwnowotworową wobec białaczki mysiej P388, raków okrężnicy Co26 i Co38, Co51, czerniaka B16 i raka płuc Lewis'a u myszy. Otrzymanie nowej grupy związków o wysokiej aktywności przeciwnowotworowej rodzi ważne pytanie odnośnie ich mechanizmu działania. Stąd też, celem niniejszego projektu finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy było zbadanie, czy triazoloakrydony II generacji – acyloksytriazoloakrydony, indukują apoptozę w komórkach białaczek ludzkich MOLT4 i HL60 oraz wyjaśnienie, jaki jest mechanizm tego zjawiska na poziomie molekularnym.

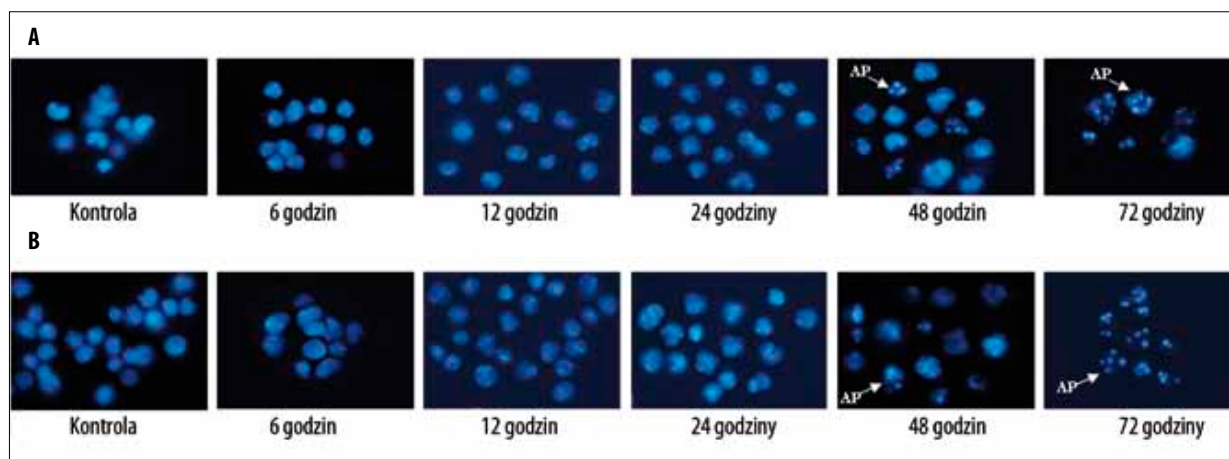
## METODYKA BADAŃ I WYNIKI

Do badań wybrano 4 pochodne z grupy acyloksytriazoloakrydonów: C-1742, C-1750, C-1764 i C-1779 różniące się podstawnikiem na grupie hydroksylowej w pozycji 8 oraz długością aminoalkilowego łańcucha bocznego. Doświadczenia przeprowadzono na komórkach białaczek ludzkich MOLT4 (białaczka limfoblastyczna) i HL60 (białaczka

mieloblastyczna), hodowanych na pożywce RPMI 1640 z 10% dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej FBS i antybiotykami (penicylina i streptomycyna), w standardowych warunkach (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% wilgotności). Czas podwojenia komórek w tych warunkach wynosił 12–14 godzin dla linii MOLT4 i 20–24 godziny dla linii HL60.

## 1. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI CYTOTOKSYCZNEJ POCHODNYCH ACYLOKSYTRIAZOLOAKRYDONÓW

W pierwszym etapie badań oznaczono aktywność cytotoksyczną wybranych pochodnych acyloksytriazoloakrydonów wobec komórek białaczek ludzkich MOLT4 i HL60. W tym celu komórki inkubowano z różnymi stężeniami badanych związków przez 48 godzin (komórki MOLT4) i 72 godziny (komórki HL60), a następnie określano liczbę komórek kontrolnych i traktowanych związkiem w liczniku Coulter-Counter, model ZBI [11]. Na podstawie krzywych zahamowania wzrostu komórek w zależności od stężenia związków wyznaczono wartości EC<sub>50</sub>, EC<sub>80</sub> i EC<sub>90</sub> tj. wartości stężeń badanych związków, przy których proliferacja komórek nowotworowych była zahamowana odpowiednio w 50%, 80% i 90% w stosunku do komórek kontrolnych. Uzyskane wyniki pokazują, że badane pochodne acyloksytriazoloakrydonów wykazują wysoką aktywność cytotoksyczną w stosunku do komórek obu linii białaczek ludzkich. Komórki białaczki limfoblastycznej MOLT4 okazały się bardziej wrażliwe na działanie acyloksytriazoloakrydonów niż komórki białaczki mieloblastycznej HL60. Stężenia hamujące proliferację komórek MOLT4 w 50% (wartości EC<sub>50</sub>) były o dwa rzędy wielkości mniejsze w porównaniu do wartości stężeń wywołujących ten sam efekt w przypadku komórek HL60. Wartości EC<sub>80</sub> i EC<sub>90</sub> były porównywalne dla obydwu linii komórkowych (Tabela 1). Podkreślenia wymaga fakt, że acyloksytriazoloakrydony okazały się bardziej cytotoksyczne w stosunku do badanych linii białaczek ludzkich niż wyjściowe triazoloakrydony. Dla porównania wartość EC<sub>50</sub> dla pochodnej triazoloakrydonu



**Rycina 2.** Morfologia jąder komórek MOLT4 (A) i HL60 (B), kontrolnych oraz traktowanych pochodną C-1750, barwionych DAPI i ocenianych przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego. Powiększenie  $\times 400$ . AP – komórki apoptotyczne.

C-1305 wynosiła  $0,016 \mu\text{M}$  dla komórek MOLT4 i  $0,12 \mu\text{M}$  dla komórek HL60 [10].

Do dalszych badań dotyczących indukcji apoptozy przez acyloksytriazoloakrydony wybrano stężenia związków odpowiadające wartościom  $\text{EC}_{90}$  (dla komórek MOLT4) i  $\text{EC}_{80}$  (dla komórek HL60). Z terapeutycznego punktu widzenia najbardziej korzystne byłoby określenie stężeń związków odpowiadających wartości  $\text{EC}_{100}$ , jednak w warunkach eksperymentalnych są one właściwie niemożliwe do wyznaczenia. Stąd dalsze badania prowadzono dla stężeń acyloksytriazoloakrydonów odpowiadających wartościom  $\text{EC}_{80}$  i  $\text{EC}_{90}$ .

## 2. BADANIE APOPTOZY W KOMÓRKACH BIAŁACZEK MOLT4 I HL60 Poddanych DZIAŁANIU ACYLOKSYTRIAZOLOAKRYDONÓW

### 2.1. Analiza zmian morfologicznych w komórkach białaczek pod wpływem acyloksytriazoloakrydonów

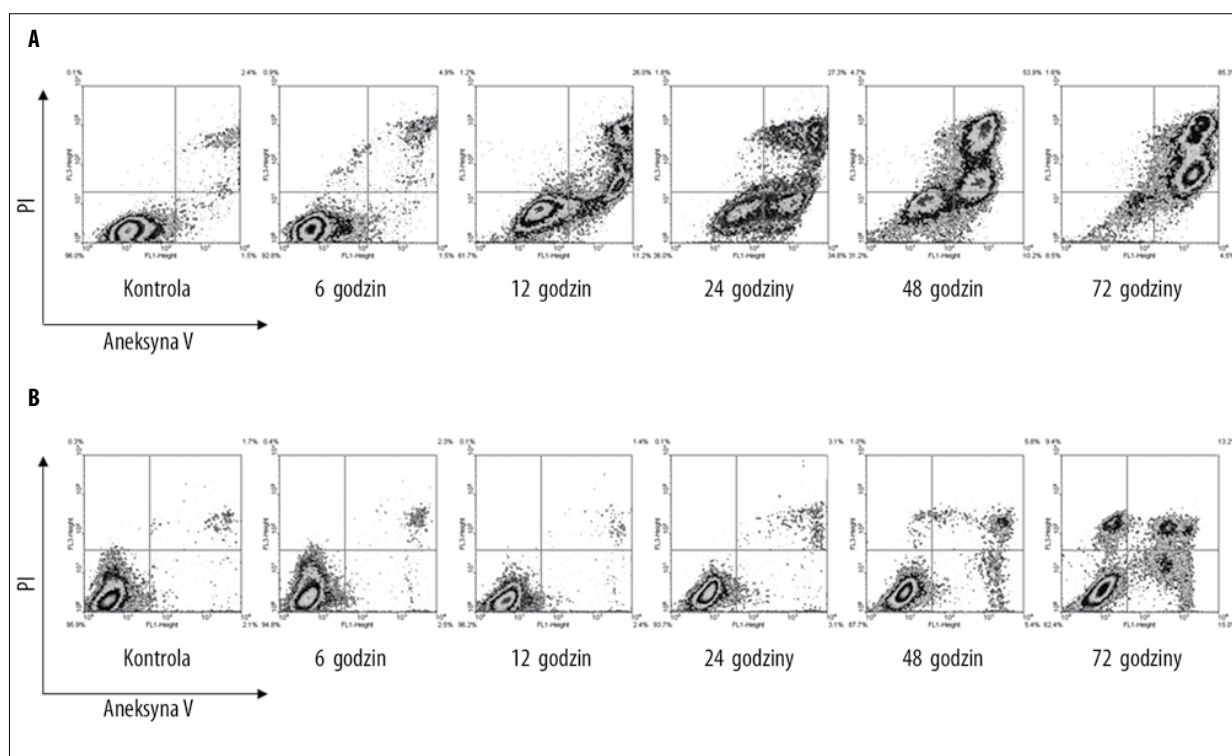
Kryterium morfologiczne jest wciąż jednym z podstawowych przy badaniu śmierci komórkowej [12]. Stąd, badanie procesu apoptozy rozpoczęto od oceny zmian w morfologii jąder komórkowych (zmian stopnia kondensacji i fragmentacji jąder) komórek MOLT4 i HL60 poddanych działaniu acyloksytriazoloakrydonów przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, po uprzednim wybarwieniu komórek za pomocą DAPI, fluorochromu wiążącego się stechiometrycznie do DNA. Dokonano kinetycznej analizy zmian morfologicznych, inkubując komórki z badanymi związkami przez 6, 12, 24, 48 i 72 godziny. Po krótszych czasach inkubacji (6, 12 godzin) obserwowano pojawianie się pojedynczych komórek nieco mniejszych od komórek kontrolnych, obkurczonych, co jest najprawdopodobniej wynikiem utraty wewnątrzkomórkowej

wody i elektrolitów, prowadzących do zagęszczenia cytoplazmy, a więc zmian typowych dla wczesnych etapów procesu apoptozy. 24 godzinna inkubacja z acyloksytriazoloakrydonami prowadziła do kondensacji chromatyny, a po 48 i 72 godzinnej inkubacji widoczna była fragmentacja jądra, oraz pojawiały się typowe dla procesu apoptozy ciała apoptotyczne (ang. *apoptotic bodies*) [13], zarówno w przypadku komórek MOLT4, jak i HL60. Na Rycinie 2 pokazano apoptotyczne zmiany w komórkach MOLT4 i HL60, przykładowo dla pochodnej C-1750.

### 2.2. Zmiany w błonie cytoplazmatycznej komórek białaczek MOLT4 i HL60 poddanych działaniu acyloksytriazoloakrydonów

Jedną z wcześniejszych i charakterystycznych zmian w komórce apoptotycznej jest utrata asymetrii w rozmieszczeniu fosfolipidów w błonie cytoplazmatycznej, polegająca na translokacji ujemnie naładowanej fosfatydyloseryny z wewnętrznej do zewnętrznej warstwy błony cytoplazmatycznej [14]. Zmianę tę można wykryć, stosując białko aneksynę V, sprzężoną z fluorochromem (np. z fluoresceiną), wykazującą wysokie powinowactwo do fosfatydyloseryny w obecności jonów wapnia. Jednocześnie, stosując kombinację barwników: aneksyna V/FITC oraz jodek propidyny (PI), można przy użyciu cytometrii przepływowej rozróżnić komórki żywe (aneksyna-/PI-), wczesnoapoptotyczne (aneksyna+/PI-), późnoapoptotyczne i nekrotyczne (aneksyna+/PI+) oraz typowo nekrotyczne (aneksyna-/PI+).

Cytometryczna analiza zmian w błonie cytoplazmatycznej komórek MOLT4 inkubowanych z acyloksytriazoloakrydonami pokazała, że już po 12 godzinnej inkubacji pojawiała się populacja komórek wczesnoapoptotycznych (barwiących się



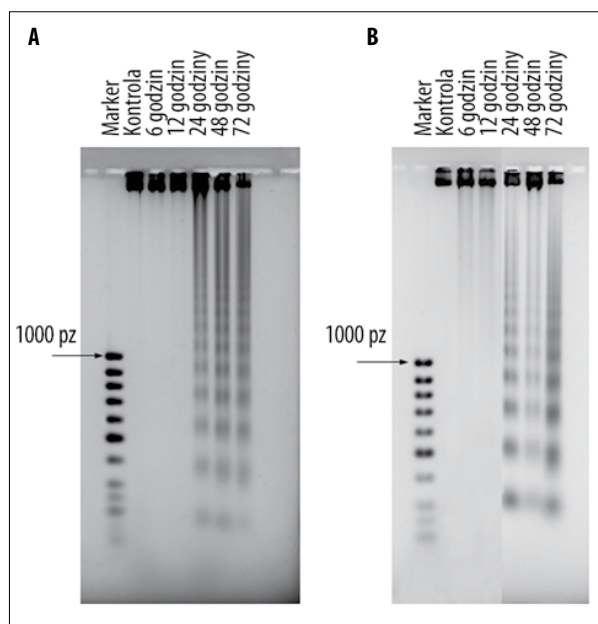
**Rycina 3.** Reprezentacyjna cytometryczna analiza zmian zachodzących w błonie plazmatycznej komórek MOLT4 (A) i HL60 (B) kontrolnych oraz traktowanych pochodną C-1742. Oś X – fluorescencja pochodząca od fluoresceiny skoniugowanej z aneksyną V; Oś Y – fluorescencja pochodząca od jodku propidyny. Lewy dolny kwadrant: komórki nieapoptotyczne (A-/PI-); prawy dolny kwadrant: komórki wczesnoapoptotyczne (A+/PI-); prawy górny kwadrant: komórki późnoapoptotyczne i nekrotyczne (A+/PI+); lewy górny kwadrant: komórki nekrotyczne (A-/PI+). Cytogramy przedstawiają jedno z 3 niezależnych doświadczeń.

jedynie aneksyną), jak i znacznie mniejsza populacja komórek późnoapoptotycznych (barwiących się aneksyną i jodkiem propidyny). Wczesna apoptoza jest zwykle procesem przejściowym, toteż w miarę upływu czasu inkubacji z badanymi związkami dochodzi do utraty integralności błony komórkowej, co objawia się wzmożonym wnikiem jodku propidyny i po 72 godzinach większość komórek to populacja późnoapoptotyczna i nekrotyczna (barwiająca się zarówno aneksyną, jak i PI). Rycina 3 przedstawia reprezentatywną analizę cytometryczną zmian zachodzących w błonie komórkowej dla pochodnej C-1742. Po 12 godzinnej ekspozycji na związek populacja komórek MOLT4 wczesnoapoptotycznych stanowiła ok. 11%, po 24 godzinach ilość komórek barwiących się jedynie aneksyną osiągała ok. 35%. Po dłuższych czasach inkubacji ilość komórek wczesnoapoptotycznych wyraźnie malała (4,5% po 72 godzinach), a wzrastała populacja komórek barwiących się aneksyną i jodkiem propidyny, która po 48 godzinach stanowiła 54% ogólnej populacji komórek, a po 72 godzinnej inkubacji ilość komórek późnoapoptotycznych i nekrotycznych stanowiła ok. 85%. Razem, po upływie 72 godzin obydwie frakcje, wczesno- i późnoapoptotyczna stanowiły ok. 90% populacji komórek, co wskazuje, że proces apoptozy odgrywa główną rolę w eliminacji komórek MOLT4 poddanych działaniu

acyloksytriazoloakrydonów. Nieco inaczej przedstawia się kinetyka zmian w błonie cytoplazmatycznej komórek HL60 poddanych działaniu acyloksytriazoloakrydonów. Analizując cytogramy pokazane na Rycinie 3 wyraźnie widać, że proces apoptozy w tych komórkach przebiega z mniejszą intensywnością niż w komórkach MOLT4. Ilość komórek wczesno- i późnoapoptotycznych osiągała po 72 godzinach inkubacji z pochodną C-1742 ok. 30%. Pojawiała się natomiast frakcja komórek nekrotycznych (barwiących się jedynie jodkiem propidyny), która po 72 godzinach wynosiła ok. 10%. Można zatem przypuszczać, iż w komórkach HL60 obok apoptozy, również proces nekrozy odgrywa istotną rolę w odpowiedzi tych komórek na działanie badanych związków.

### 2.3. Fragmentacja DNA w komórkach MOLT4 i HL60 inkubowanych z acyloksytriazoloakrydonami

Kolejną, biochemiczną zmianą typową dla śmierci apoptotycznej jest degradacja DNA, zwykle na odcinki ok. 200 par zasad, będące wielokrotnością nukleosomów, co daje na żelu agarozowym obraz tzw. drabinki apoptotycznej (ang. *laddering*). Jak pokazano na Rycinie 4, wyraźna oligonukleosomalna degradacja DNA w komórkach MOLT4

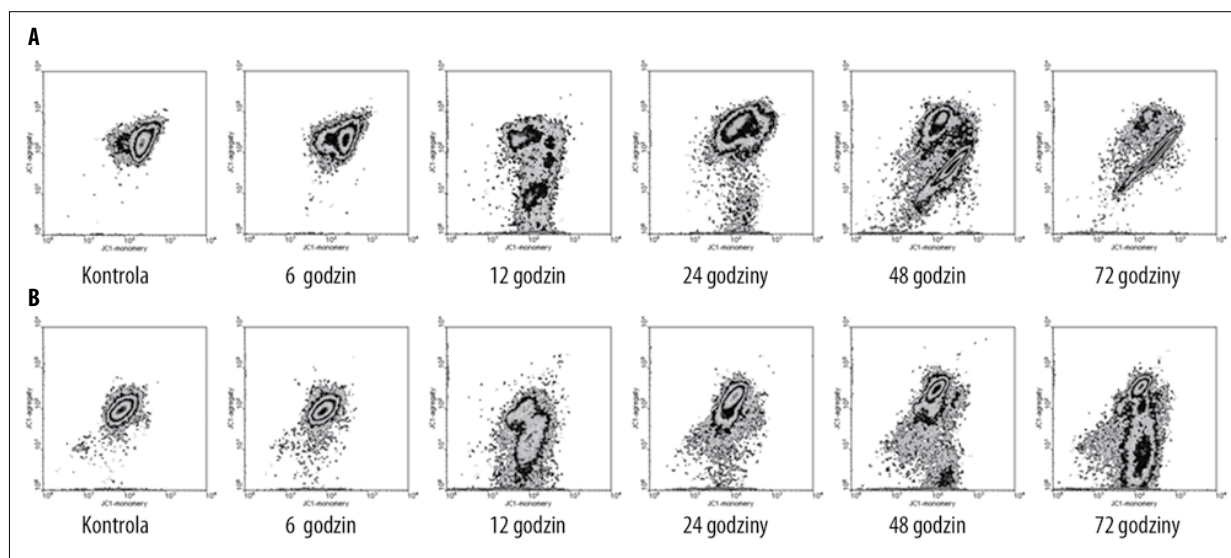


**Rycina 4.** Międzynukleosomalna fragmentacja DNA w komórkach MOLT4 (A) i HL60 (B) traktowanych pochodną C-1750 przez podaną ilość godzin. Jako wzorzec (marker) użyto DNA o wielkości fragmentów od 10 do 1000 par zasad.

i pojawianie się ciałek apoptotycznych miały miejsce również po dłuższych czasach inkubacji komórek z acyloksytriazoloakrydonami.

#### 2.4. Określenie roli mitochondriów w procesie apoptozy indukowanej w komórkach MOLT4 i HL60 przez acyloksytriazoloakrydony

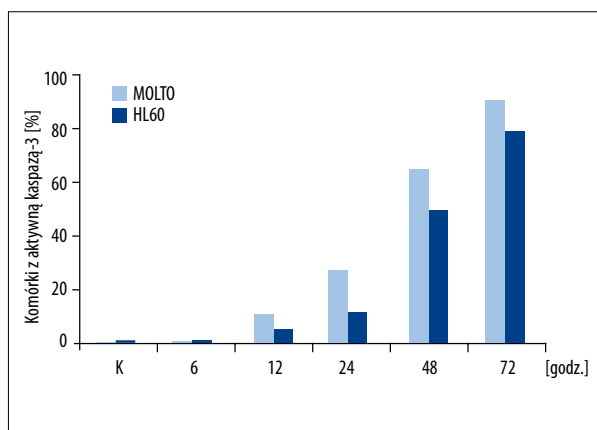
Mitochondria odgrywają kluczową rolę w procesie apoptozy [16,17]. Jednym z ważniejszych parametrów określających dysfunkcję mitochondriów podczas apoptozy jest spadek mitochondrialnego potencjału błonowego  $\Delta\Psi_m$  na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Jest to wydarzenie uniwersalne, a zarazem nieodwracalne dla śmierci apoptotycznej [18]. W celu oznaczenia depolaryzacji mitochondriów zastosowano lipofilowy barwnik kationowy JC-1. Wnika on selektywnie do mitochondriów i w przypadku spolaryzowanej błony mitochondrialnej i wysokiego potencjału  $\Delta\Psi_m$  tworzy agregaty (emituje fluorescencję pomarańczową), a w przypadku spadku potencjału barwnik przechodzi w formę monomeryczną (emituje wówczas fluorescencję zieloną) [19]. Uzyskane wyniki



**Rycina 5.** Cytometryczna analiza zmian mitochondrialnego potencjału błonowego w komórkach MOLT4 (A) i HL60 (B) kontrolnych oraz traktowanych pochodną C-1750. Oś X – intensywność fluorescencji pochodząca od monomerów JC-1; Oś Y – intensywność fluorescencji pochodząca od agregatów JC-1. Cytogramy przedstawiają jedno z dwóch niezależnych doświadczeń.

i HL60 zachodziła po 24, 48 i 72 godzinach inkubacji z pochodną C-1750. W przypadku komórek obu linii, po 6 i 12 godzinach ekspozycji na badane związki, fragmentacja DNA na odcinki oligonukleosomalne nie była widoczna, co jest zgodne z ogólnie przyjętym poglądem, że ten typ fragmentacji należy zwykle do późnych etapów śmierci apoptotycznej [15]. Otrzymane wyniki są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami zmian w morfologii jąder komórkowych, gdzie degradacja DNA

dwuparametrowej analizy cytometrycznej komórek MOLT4 i HL60 traktowanych acyloksytriazoloakrydonami i barwionych JC-1, wyraźnie świadczy o depolaryzacji mitochondriów, postępującej wraz ze wzrostem czasu ekspozycji komórek na badane związki (Rycina 5). Odnosząc się do komórek kontrolnych, krótka 6 godzinna inkubacja nie prowadziła do istotnych zmian w ilości komórek z niskim potencjałem mitochondrialnym. Po czynając od 12 godzin, frakcja komórek z niskim



**Rycina 6.** Odsetek komórek MOLT4 i HL60 zawierających aktywną kaspazę-3 w zależności od czasu inkubacji z pochodną C-1750. Wyniki przedstawiają jedno z dwóch niezależnych doświadczeń.

potencjałem  $\Delta\Psi_m$  stopniowo rosła i efekt ten się wyraźnie nasilał po 48 i 72 godzinach inkubacji z acyloksytriazoloakrydonami.

Porównując analizę zmian  $\Delta\Psi_m$  i oligonukleosomalną fragmentację DNA, widać wyraźnie, że spadek mitochondrialnego potencjału błonowego poprzedza apoptotyczną fragmentację DNA.

### 2.5. Badanie aktywności kaspazy-3 w procesie apoptozy komórek białaczek ludzkich indukowanej przez acyloksytriazoloakrydony

Ponieważ w komórkach MOLT4 i HL60 traktowanych acyloksytriazoloakrydonami doszło do zaburzenia funkcji mitochondriów, należało się spodziewać, że w komórkach tych nastąpi również uruchomienie kaskady kaspaz, a zwłaszcza efektorowej kaspazy-3, zaangażowanej w tzw. egzekucyjną fazę procesu apoptozy [20]. Technika cytometrii przepływowej, z zastosowaniem przeciwciała rozpoznającego aktywną formę kaspazy-3, sprawdzono czy apoptoza indukowana przez acyloksytriazoloakrydony przebiega w komórkach białaczek ludzkich z udziałem tej kaspazy. Uzyskane rezultaty wskazują wyraźnie, że zarówno w komórkach MOLT4, jak i HL60 doszło do aktywacji wykonawczej kaspazy-3 (Rycina 6). Wykres przedstawia kinetykę wzrostu liczby komórek MOLT4 i HL60 traktowanych pochodną C-1750 przez 6, 12, 24, 48 i 72 godziny. W przypadku obu linii komórkowych niewielką frakcją komórek zawierających aktywną kaspazę-3 (ok. 1%) obserwowano po 6 godzinach inkubacji ze związkami. Populacja ta znacząco wzrosła po upływie 24 godzin w komórkach MOLT4 (ok. 26%) i po upływie 48 godzin w komórkach HL60 (ok. 42%). Po 72 godzinach populacja komórek z aktywną kaspazą-3 była dominująca w komórkach obu linii (82% MOLT4 i 76% HL60).

## PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Otrzymana w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej nowa grupa triazoloakrydonów II generacji – acyloksytriazoloakrydony, wykazała wysoką aktywność cytotoksyczną wobec komórek białaczek ludzkich MOLT4 i HL60. Ważnym z terapeutycznego punktu widzenia jest fakt, że acyloksytriazoloakrydony wykazały znacząco wyższą aktywność cytotoksyczną wobec komórek badanych linii niż wyjściowe triazoloakrydony. Badając mechanizm działania acyloksytriazoloakrydonów na poziomie komórkowym po raz pierwszy wykazano, że związki te indukują apoptozę w komórkach białaczek ludzkich MOLT4 i HL60 w stężeniach biologicznie istotnych, odpowiadających wartościom  $EC_{80}$  i  $EC_{90}$ . W komórkach obu linii MOLT4 i HL60 traktowanych acyloksytriazoloakrydonami obserwowano typowe dla apoptozy zmiany w wyglądzie jąder komórkowych (kondensacja i fragmentacja chromatyny, prowadzące do powstawania tzw. ciałek apoptotycznych). Dalsze badania zjawiska apoptozy w oparciu o szereg typowych dla tego procesu znaczników biochemicznych, takich jak: translokacja fosfatydyloseryny, międzynukleosomalna fragmentacja DNA, spadek mitochondrialnego potencjału błonowego, czy aktywacja kaspazy-3 potwierdziły, że apoptoza odgrywa główną rolę w eliminacji komórek MOLT4 i HL60 poddanych działaniu acyloksytriazoloakrydonów. Ten typ śmierci komórkowej był szczególnie dominujący w przypadku komórek MOLT4 – po 72 godzinach ok. 90% całkowitej populacji komórek wykazywało zmiany typowe dla apoptozy. Podsumowując, komórkowy mechanizm działania acyloksytriazoloakrydonów w przypadku białaczek ludzkich MOLT4 i HL60 jest bardzo podobny jak w przypadku triazoloakrydonów [10]. Obie grupy związków w stężeniach biologicznie istotnych indukują apoptozę w komórkach nowotworowych. Proces apoptozy komórek białaczek MOLT4 i HL60 przebiegał według mitochondrialnej drogi aktywacji kaspaz, obejmującej spadek mitochondrialnego potencjału błonowego, aktywację kaspazy-3, translokację fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony plazmatycznej oraz fragmentację DNA do poziomu nukleosomów. Co więcej, nowa grupa triazoloakrydonów II generacji odznaczała się znacząco wyższą aktywnością cytotoksyczną w stosunku do komórek białaczek ludzkich, niż wyjściowe triazoloakrydony, co w przyszłej terapii może być podstawą do stosowania niższych dawek leków z grupy triazoloakrydonu. Uzyskane w trakcie realizacji projektu finansowanego przez Naukową Fundację Polpahrmy wyniki, dotyczące mechanizmu działania nowej grupy związków o właściwościach przeciwnowotworowych, mogą w przyszłości stać

się przydatne do projektowania struktur nowych związków o podobnym mechanizmie działania. Poza tym wiedza o mechanizmie działania na poziomie komórkowym może być pomocna w selekcji acyloksytriazoloakrydonów do rozszerzonych badań przedklinicznych. Uzyskane wyniki badań mogą być również zastosowane w ewentualnych przyszłych opracowaniach optymalnego schematu dawkowania w terapii mono- i wielolekowej.

#### Piśmiennictwo:

- Guchelar HJ, Vermes A, Vermes I i wsp.: Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy. *Pharm World Science*, 1997; 9: 119–25
- Pecorino L: Molecular biology of cancer. Mechanisms, targets, and therapeutics. Second edition. Oxford New York: Oxford University Press, 2008
- Radzikowski C: Ledakrin – a new polish antitumor drug. *Materia Med Polonia*, 1976; 8: 56–57
- Cholody WM, Martelli S, Paradziej-Łukowicz J i wsp.: 5-[(aminoalkyl)amino]imidazo[4,5,1-de]acridin-6-ones as a novel class of antineoplastic agents. Synthesis and biological activity. *J Med Chem*, 1990; 33: 49–52
- Capizzi RL, Roman LA, Tjulandin S i wsp.: Phase II trial of C-1311, a novel inhibitor of topoisomerase II in advanced breast cancer. *J Clin Oncol*, 2008; 26: 1055
- Chołody MW, Martelli S, Konopa J: 8-substituted 5-[(aminoalkyl)amino]-6H-v-triazolo[4,5,1-de]acridin-6-ones as a potential antineoplastic agents. *J Med Chem*, 1990; 33: 2852–56
- Kuśnierczyk H, Chołody MW, Paradziej-Łukowicz J i wsp.: Experimental antitumor activity and toxicity of the selected triazolo- and imidazoacridinones. *Arch Immunol Ther Exp*, 1994; 42: 415–23
- Lemke K, Poindessous V, Składanowski A i wsp.: The antitumor triazoloacridone C-1305 is a topoisomerase II poison with unusual properties. *Mol Pharmacol*, 2004; 66: 1035–42
- Koba M, Konopa J: Interaction of antitumor triazoloacridinones with DNA. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 2002; 43: 959
- Augustin E, Moś-Rompa A, Skwarska A i wsp.: Induction of G2/M phase arrest and apoptosis of human leukemia cells by potent antitumor triazoloacridinone C-1305. *Biochem Pharmacol*, 2006; 72: 1668–79. *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*
- Bhuyan K, Smith KS, Adams EG i wsp.: Lethality, DNA alkylation and cell cycle effects of adozelesin (U-73975) on rodent and human cells. *Cancer Res*, 1992; 52: 5687–92
- Rello S, Stockert JC, Moreno V i wsp.: Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatment. *Apoptosis*, 2005; 10: 201–8
- Kerr JF, Wyllie AH, Curie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26: 239–57
- Kagan VE, Fabisiak JP, Shvedova AA i wsp.: Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett*, 2000; 477: 1–7
- Geshke J, Gerschenson LE: The biology of apoptosis. *Human Pathol* 2001; 32: 1029–38
- Kroemer G, Reed JC: Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.*, 2000; 6: 513–19
- Gao LW, Zhang J, Yang WH i wsp.: Glaucocalyxin A induces apoptosis in human leukemia HL-60 cells through mitochondria-mediated pathway. *Toxicol In Vitro*, 2010; 25: 51–63
- Ly JD, Grubb DR, Lawen A: The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi(m)$ ) in apoptosis. *Apoptosis*, 2003; 8: 115–28
- Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G i wsp.: A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun*, 1993; 197: 40–45
- Kumar S: Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*, 2007; 14: 32–43

#### PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję współrealizatorom grantu: dr inż. Annie Skwarskiej, dr inż. Annie Moś-Rompa i dr inż. Kamili Siedleckiej. Panu mgr inż. Tomaszowi Laskowskiemu za pomoc w przygotowaniu rycin.



# Nowe testy diagnostyczne oparte o antygeny rekombinantowe *Toxoplasma gondii* do wykrywania oraz różnicowania fazy wczesnej i przewlekłej toksoplazmozy

## New diagnostics tests based on the *Toxoplasma gondii* recombinant antigens for detection and differentiation acute and chronic phase of toxoplasmosis

Lucyna Holec-Gąsior,  
Józef Kur

Wydział Chemiczny, Katedra Mikrobiologii, Politechnika Gdańska, Gdańsk

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2006 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem prof. Józefa Kura grant na realizację projektu badawczego pt. *Konstrukcja serologicznych zestawów diagnostycznych rozpoznających i różnicujących toksoplazmozę wczesną i przewlekłą.*

### Streszczenie

Toksoplazmoza jest jedną z najbardziej powszechnych chorób pasożytniczych człowieka i zwierząt stałocieplnych. Na świecie jedna trzecia ludzkiej populacji jest chronicznie zarażona *Toxoplasma gondii*. Mimo, iż choroba ta u zdrowych, dorosłych osób zazwyczaj ma charakter bezobjawowy, bardzo poważne objawy mogą wystąpić w przypadku wrodzonego zarażenia oraz u osób z niedoborem odporności. Ponadto, pomimo dokładnego poznania jej etiologii nadal stanowi bardzo poważny problem diagnostyczny. Diagnostyka toksoplazmozy jest głównie oparta o wyniki badań serologicznych, w których wykrywa się specyficzne przeciwciała anti-*T. gondii*. Specyficzność i czułość testów serologicznych zależy przede wszystkim od użytych antygenów. Obecnie komercyjnie dostępne zestawy diagnostyczne oparte są na poliwalentnym antygenie natywnym pasożyta (TLA). Zatem rekombinantowe białka antygenowe *T. gondii* mogą być alternatywnym źródłem antygenów bardzo użytecznym w serodiagnostyce toksoplazmozy. W artykule przedstawiono najnowsze dane dotyczące badań nad wykorzystaniem antygenów rekombinantowych pasożyta *T. gondii* w serodiagnostyce toksoplazmozy u ludzi.

**Słowa kluczowe:** *Toxoplasma gondii* • toksoplazmoza • diagnostyka serologiczna • antygeny rekombinantowe

### Summary

Toxoplasmosis is one of the most common parasitic diseases of humans and warm-blooded animals. One third of the human population in the world is chronically infected with *Toxoplasma gondii*. Although human toxoplasmosis in healthy adults is usually asymptomatic, a serious disease can occur in the case of a congenital infection and immunocompromised individuals. Furthermore, despite the exact recognition of its etiology it is still serious diagnostic problem. Diagnosis of toxoplasmosis is mainly based on the results of serological tests detecting anti-*T. gondii* specific antibodies. The specificities and sensitivities of serology tests depend mostly on the diagnostic antigen(s) used. The currently available commercial serological kits are based on the *Toxoplasma* lysate antigens (TLAs). Thus recombinant antigenic protein of *T. gondii* may be the alternative source of antigens very useful for serodiagnosis of toxoplasmosis. This article presents current studies on the application and the usefulness of *T. gondii* recombinant antigens in serological tests for the diagnosis of human toxoplasmosis.

**Key words:** *Toxoplasma gondii* • toxoplasmosis • serological diagnosis • recombinant antigens

Wpłynęło: 14-12-2010  
Zaakceptowano: 12-02-2011  
Opublikowano: 30-03-2011

---

**Adres do korespondencji:**  
dr inż. Lucyna Holec-Gąsior,  
Katedra Mikrobiologii,  
Wydział Chemiczny,  
Politechnika Gdańska,  
ul. Narutowicza 11/12,  
80-233 Gdańsk,  
e-mail: holec@pg.gda.pl

## WSTĘP

Toksoplazmoza jest chorobą szeroko rozpowszechnioną na całym świecie, którą wywołuje wewnątrzkomórkowy pasożyt *Toxoplasma gondii* należący do typu Apicomplexa. Tak jak wszystkie organizmy należące do tego typu, pasożyt ten charakteryzuje się złożonym cyklem rozwojowym, który przebiega zarówno u żywiciela ostatecznego (tj. kota domowego i innych kotowatych), jak i u żywicieli pośrednich (wielu gatunków zwierząt, w tym u człowieka), gdzie namnaża się tylko bezpłciowo. Postacią inwazyjną zarówno dla ostatecznego, jak i pośredniego żywiciela są oocysty przekształcone w sporocysty, które powstają w wyniku rozmnażania płciowego zachodzącego w komórkach nabłonka jelita cienkiego kota. Ta forma rozwojowa pasożyta jest bardzo wytrzymała na działanie czynników zewnętrznych i w naturalnych warunkach środowiskowych może pozostać zakaźna ponad rok. Zakaźne dla żywicieli są także formy wegetatywne pasożyta (tachyzoity) oraz zamknięte w cyście tkankowej bradyzoity, które powstają w wyniku rozwoju bezpłciowego [1,2]. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia szacuje się, iż nabyte zarażenie *T. gondii* jest udziałem około 1/3 ludności świata. W populacji ludzkiej częstość zarażenia jest uzależniona od bardzo wielu czynników takich jak klimat, zwyczaje sanitarno-żywnieniowe oraz warunki socjalno-ekonomiczne. Źródłem zarażenia jest najczęściej pokarm zanieczyszczony oocystami wydalانymi przez kota lub półsurowe mięso zwierząt hodowlanych (głównie świń, owiec i bydła) zawierające cysty tkankowe pasożyta (nabyta postać choroby). W toksoplazmozie wrodzonej źródłem inwazji jest łożysko zarażonej matki [3]. Do zarażenia płodu dochodzi wyłącznie podczas czynnej, pierwotnej inwazji *T. gondii* u matki. Toksoplazmoza u zdrowych dorosłych osób przebiega przeważnie bezobjawowo i nie wymaga leczenia. Łagodne objawy kliniczne, często przypominające grypę, są notowane u niewielkiego odsetka pacjentów. Choroba ta może mieć natomiast bardzo ciężki przebieg u płodów oraz u osób z niedoborem odporności, przy czym należy zwrócić uwagę na fakt, iż konsekwencje inwazji u zarażonych płodów bywają często dramatyczne. Z tego względu, iż ryzyko zarażenia u ciężarnych z pierwotną toksoplazmozą, które nie otrzymują leczenia jest bardzo wysokie, prawidłowe rozpoznanie i leczenie inwazji w tych przypadkach jest konieczne. Częstość występowania pierwotnej toksoplazmozy u kobiet ciężarnych zależy w dużej mierze od prawdopodobieństwa zarażenia się podczas ciąży w danym rejonie geograficznym, natomiast na transmisję zarażenia na płód ma wpływ stopień parazytemii u matki, dojrzałości łożyska oraz wiek płodowy. Toksoplazmoza wrodzona może ujawnić się w szerokim spektrum objawów klinicznych, które w dużym

stopniu zależą od okresu zarażenia płodu podczas ciąży. Ryzyko takie wzrasta wraz z trwaniem ciąży i wynosi odpowiednio 17%, 25% i 65% podczas I, II i III trymestru oraz ok. 90% w ostatnich tygodniach ciąży [4], natomiast stopień powikłań jest odwrotnie proporcjonalny do okresu, w którym nastąpiło zarażenie u matki [5]. Płody zarażone w I trymestrze ciąży ulegają zwykle poronieniu lub umierają w okresie noworodkowym z powodu różnych zmian patologicznych. Zarażenie płodu w środkowym lub ostatnim trymestrze ciąży może mieć zróżnicowany obraz kliniczny: od przypadków bezobjawowych do przypadku tzw. triady Sabina-Pinkertona, która charakteryzuje się wodogłowiem lub małopłowiem, zapaleniem siatkówki i naczyniówki oraz zwapnieniem śródczaszkowym. Wymienionym objawom towarzyszyć może znaczne opóźnienie rozwoju umysłowego i fizycznego. Ponadto w przypadku znacznego procenta noworodków nie wykazujących jakichkolwiek objawów klinicznych bezpośrednio po urodzeniu, objawy choroby mogą ujawnić się dopiero w późniejszym okresie życia dziecka (dziecięcym lub młodzieńczym) [3]. Ze względu na możliwość utraty ciąży oraz trwały lub postępujący charakter wielonarządowych uszkodzeń, a także śmierć dziecka, toksoplazmoza wrodzona stanowi bardzo poważny problem kliniczny, zwłaszcza w położnictwie i pediatrii. Prawidłowe rozpoznanie choroby jest nieodzownym warunkiem odpowiednich decyzji dotyczących przede wszystkim leczenia oraz zapobiegania toksoplazmozie. Największe znaczenie i zarazem wyzwanie stanowi określenie momentu inwazji *T. gondii* u kobiety ciężarnej (toksoplazmoza wczesna lub przewlekła), ponieważ przyjmuje się, iż jedynie pierwotne, aktywne zarażenie stanowi poważne zagrożenie dla płodu (poronienie lub narodziny dziecka z wadami wrodzonymi). Zatem właściwe rozpoznanie fazy choroby i możliwość leczenia kobiety ciężarnej może uchronić płód przed zarażeniem oraz przykrymi skutkami, które powoduje toksoplazmoza wrodzona.

## DIAGNOSTYKA TOKSOPLAZMOZY

Podstawą współczesnej diagnostyki toksoplazmozy są badania serologiczne, które polegają na wykryciu w surowicy lub płynach ustrojowych osób zarażonych pasożytem specyficznych przeciwciał anti-*T. gondii* klasy IgG, IgM oraz w niektórych przypadkach IgA. Badania serologiczne obejmują różne laboratoryjne metody diagnostyczne, które cechuje wysoka czułość i swoistość. Obecnie w komercyjnie dostępnych testach diagnostycznych, do wykrywania specyficznych przeciwciał antytoksoplazmozowych, wykorzystuje się różne preparaty antygenowe izolowane z tachyzoitów, otrzymanych z płynu otrzewnowego zarażonych myszy lub

**Tabela 1.** Kolekcja antygenów rekombinantowych *T. gondii*.

Rodzina	Nazwa antygenu rekombinantowego*	Forma rozwojowa
Antygeny powierzchniowe SAG (ang. Surface Antigens)	SAG1-His SAG2-His SAG4-His P35-His BSR4-His	tachyzoit tachyzoit/bradyzoit bradyzoit tachyzoit bradyzoit
Antygeny granul o dużej gęstości GRA (ang. Dense Granule Antigens)	GRA1-His GRA2-His/GRA2ex2-His GRA4-His GRA5-His/GRA5-Trx GRA6-His GRA7-His GRA9-His	tachyzoit/bradyzoit tachyzoit/bradyzoit tachyzoit/bradyzoit tachyzoit/bradyzoit tachyzoit/bradyzoit tachyzoit/bradyzoit tachyzoit/bradyzoit
Antygeny roptrii ROP (ang. Rhoptry Antigens)	ROP1-His ROP7-His ROP9-His	tachyzoit/bradyzoit tachyzoit/bradyzoit tachyzoit
Antygeny mikronem MIC (ang. Microneme Antigens)	MIC1ex2-His/Mic1ex3,4-His MIC3-His/MIC3-Trx	tachyzoit/bradyzoit tachyzoit/bradyzoit
Enzymy	LDH1-His LDH2-His	tachyzoit bradyzoit
Inne	MAG1-His BAG1-His	tachyzoit/bradyzoit bradyzoit

\* Człon nazwy antygeny rekombinantowego His oznacza białko fuzyjne zawierające dwie domeny oligohistydynowe na N- i C-końcu; Trx – białko fuzyjne zawierające dodatkowo domenę tioredoksynową na N-końcu.

z kultur tkankowych *in vitro*. Jest to, przygotowana w odpowiednich proporcjach, mieszanina antygenów cytoplazmatycznych i błonowych. Otrzymanie tzw. poliwalentnego antygeny natywnego (TLA, ang. *Toxoplasma lysate* antygen) jest uciążliwe i trudne, ponieważ wymaga hodowli pasożyta *in vivo* na myszach lub w hodowli tkankowej *in vitro*. Ponadto interpretacja wyników badań serologicznych (uzyskanych w niektórych przypadkach z wykorzystaniem testów, w których do wykrywania specyficznych przeciwciał stosuje się TLA), może być trudna i niewystarczająca dla rozpoznania fazy choroby. Z tego też powodu w licznych laboratoriach na całym świecie prowadzone są badania, w których poszukuje się nowych narzędzi diagnostycznych mogących znaleźć zastosowanie w testach serologicznych rozpoznających toksoplazmozę oraz różnicujących jej fazy. Obecnie dużą uwagę skupia się na antygenach rekombinantowych *T. gondii*, otrzymywanych z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej i biologii molekularnej. Zatem rekombinantowe białka stanowią alternatywne źródło antygenów mogących zastąpić poliwalentny antygen natywny pasożyta wykorzystywany obecnie w komercyjnie dostępnych zestawach diagnostycznych.

#### ANTYGENY REKOMBINANTOWE W DIAGNOSTYCE TOKSOPLAZMOZY

Czułość i efektywność testów serologicznych zależy w głównej mierze od dwóch czynników. Pierwszym

z nich jest poziom przeciwciał produkowanych przez organizm w odpowiedzi na przebyte zarażenie, a drugi stanowi zastosowany w teście antygen (rozpoznający specyficzne immunoglobuliny). W przypadku konstrukcji zestawów diagnostycznych wykorzystujących metody serologiczne, o ile nie ma się wpływu na pierwszy z tych czynników, o tyle istnieje możliwość dużego wyboru antygenów, które zasadniczo wpływają na czułość i specyficzność testów. Rozwój metod biologii molekularnej oraz inżynierii genetycznej stworzył nowe możliwości w otrzymywaniu coraz to lepszych i bardziej skutecznych narzędzi diagnostycznych. Antygeny rekombinantowe, produkowane w bakteryjnych lub eukariotycznych systemach ekspresyjnych, stanowią nową grupę odczynników immunodiagnostycznych o bardzo wysokiej jakości. Stosowanie rekombinantowych białek antygenowych, jako specyficznych markerów rozpoznających przeciwciała, jest szczególnie wskazane do sprawdzania obecności patogenów wywołujących różne rodzaje odpowiedzi immunologicznej, którymi zarażenie prowadzi do przewlekłych inwazji lub w przypadku patogenów, które po inwazji ostrej przechodzą w stan utajony (tak jak w przypadku *T. gondii*).

Prace dotyczące otrzymywania i zastosowania w diagnostycznych testach serologicznych rekombinantowych białek antygenowych *T. gondii* prowadzone są przez zespół naukowy Katedry Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej już od kilku lat. Dotychczas

otrzymano ponad dwadzieścia antygenów rekombinantowych pasożyta (charakterystycznych dla formy rozwojowej tachyzoitu jak i bradyzoitu), które według naszej wiedzy są najprawdopodobniej największym zbiorem białek antygenowych *T. gondii* na świecie (Tabela 1). Ponadto dzięki wsparciu finansowemu Naukowej Fundacji Polpharmy możliwe było przeprowadzenie badań, dzięki którym oszacowano przydatność diagnostyczną poszczególnych antygenów oraz opracowano prototypy nowych testów serologicznych do wykrywania specyficznych przeciwciał antytoksoplazmowych w surowicach chorych pacjentów.

#### RÓŻNICOWANIE FAZ CHOROBY Z ZASTOSOWANIEM ANTYGENÓW REKOMBINANTOWYCH

Wśród dostępnych obecnie zestawów serologicznych stosowanych w diagnostyce toksoplazmozy brak techniki idealnej o uniwersalnym charakterze. Główną wadą wykorzystywanych testów jest brak możliwości różnicowania wczesnej i przewlekłej inwazji pasożyta oraz odróżnienia pierwotnego zarażenia od reaktywacji zarażenia utajonego, nabytego w przeszłości. Precyzyjne określenie fazy choroby stanowi szczególnie istotny problem w przypadku kobiet ciężarnych. Przez bardzo długi okres czasu uważano, iż wykrycie w surowicy osoby zarażonej przeciwciał klasy IgM, pojawiających się w pierwszych tygodniach choroby, jest markerem wczesnego zarażenia *T. gondii*. Interpretacja wyników badań serologicznych, czyli obecności i miana przeciwciał klasy IgG i IgM, w niektórych przypadkach może być jednak bardzo trudna. Wynika to z faktu, że w populacji osób dorosłych, które przebyły zarażenie, przeciwciała klasy IgG mogą utrzymywać się bardzo długo na podwyższonym poziomie. Natomiast stężenie przeciwciał klasy IgM może być podwyższone wiele lat po aktywnej toksoplazmozie. Przeciwciała te mogą być wykrywane w surowicy niektórych osób nawet do 48–72 miesięcy po zarażeniu, a czasem utrzymują się aż przez kilkanaście lat [6]. Ponadto, większość (75%) noworodków z wrodzoną toksoplazmozą nie wytwarza przeciwciał klasy IgM, co spowodowane jest immunosupresją układu immunologicznego dziecka przez matczyne przeciwciała klasy IgG anty-*T. gondii*, przechodzące przez łożysko. U dorosłych na skutek obniżenia odporności (np. leki, choroba nowotworowa, przeszczep) dochodzi do reaktywacji przewlekłego bezobjawowego zarażenia, przeciwciała klasy IgM zazwyczaj wtedy nie występują, a klasy IgG mogą utrzymywać się na niskim lub średnim poziomie, nie wskazując na aktywną toksoplazmozę. Tak więc, oznaczenie obecności przeciwciał klasy IgM i stężenia IgG może nie wystarczyć do prawidłowej oceny

stadium zarażenia pierwotniakiem *T. gondii*. Z tego też powodu wykorzystanie w serodiagnostyce toksoplazmozy odpowiednio wyselekcjonowanych antygenów rekombinantowych, charakterystycznych dla różnych form rozwojowych pasożyta (np. tachyzoitów, występujących na początku inwazji lub bradyzoitów ukrytych w cystach tkankowych, które pojawiają się w organizmie gospodarza w fazie przewlekłej choroby) daje zupełnie nowe możliwości. W ciągu ostatniej dekady badania nad poszukiwaniem takich markerów molekularnych, reagujących specyficznie z przeciwciałami antytoksoplazmowymi pochodzącymi z surowic pacjentów z toksoplazmozą wczesną lub przewlekłą, zakończyły się sukcesem. Wśród wielu badanych antygenów wyselekcjonowano głównie białka, które są markerami fazy wczesnej choroby (Tabela 2). W naszych badaniach najlepsze rezultaty w rozpoznawaniu przeciwciał anty-*T. gondii* klasy IgG, charakterystycznych dla fazy ostrej toksoplazmozy, otrzymano dla trzech antygenów rekombinantowych: MAG1, ROP1, GRA2 [12,13]. Białka te rozpoznawały specyficzne IgG z czułością bliską lub równą 100%, podczas gdy czułość testu IgG ELISA, w którym testowano surowice pacjentów z chroniczną fazą choroby, była zdecydowanie niższa (wynosiła kilka lub kilkanaście procent). Zidentyfikowanie takich markerów molekularnych umożliwia rozpoznanie fazy choroby na podstawie badania pojedynczej próby surowicy danego pacjenta. Takiej możliwości nie dają obecnie wykorzystywane testy diagnostyczne, które oparte są na TLA. Wyniki naszych badań potwierdziły, iż stosowany w komercyjnie dostępnych testach antygen natywny *T. gondii* nie różnicuje faz choroby (Rycina 1). Preparat ten z porównywalną czułością rozpoznaje wczesne jak i późne przeciwciała IgG, podczas gdy zupełnie inne rezultaty otrzymuje się stosując w teście diagnostycznym odpowiednio wyselekcjonowane rekombinantowe białka antygenowe *T. gondii*. Zatem w tym momencie można mówić o pewnego rodzaju rewolucji w diagnostyce toksoplazmozy, która możliwa jest dzięki wykryciu a następnie zastosowaniu do badań serologicznych tzw. molekularnych markerów charakterystycznych dla poszczególnych faz choroby.

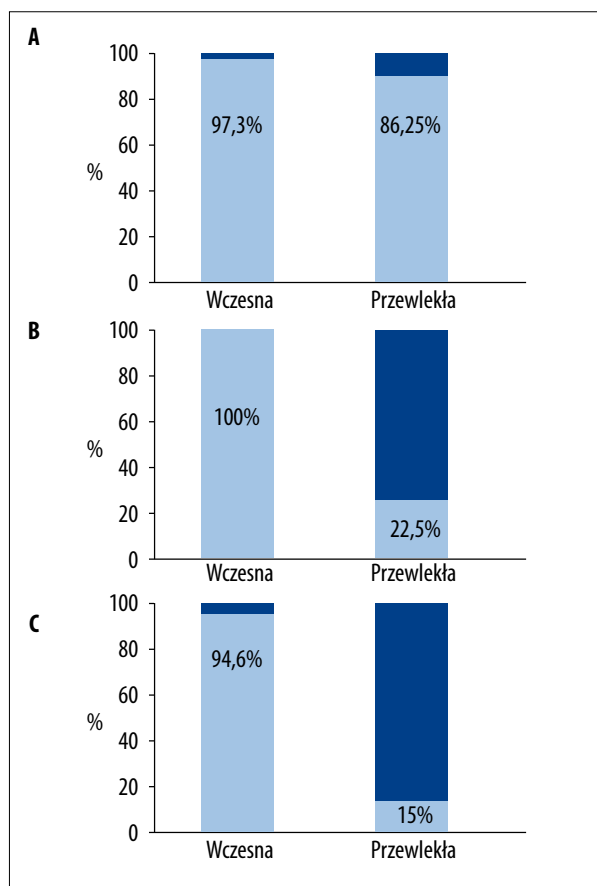
#### MIESZANKI BIAŁEK REKOMBINANTOWYCH

Badania nad wykorzystaniem w serodiagnostyce toksoplazmozy nowych narzędzi diagnostycznych (antygenów rekombinantowych) pokazały, iż reaktywność niektórych z nich ze specyficznymi przeciwciałami anty-*T. gondii* klasy IgG lub IgM jest na bardzo niskim poziomie. Ponadto w przypadku niektórych prób surowic brakuje specyficznych przeciwciał rozpoznających dane białko rekombinantowe. Spowodowane jest to tym, iż pasożyty

**Tabela 2.** Antygeny rekombinantowe *T. gondii* – molekularne markery fazy toksoplazmozy.

Antygen	System ekspresyjny / białko	Wykrywane przeciwciała / test diagnostyczny	Ilość przebadanych surowic pozytywnych (*)	Wyniki	Literatura #
P35	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną GST	IgM ELISA	53 prób: • 20 (t. wczesna) • 33 (t. przewlekła)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą wczesną: 90%</li> <li>• brak reaktywności antygenu z przeciwciałami IgM zawartymi w surowicach z toksoplazmozą przewlekłą</li> </ul>	[7]
GRA4	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną His-Tag	IgG ELISA	36 prób: • 12 (t. wczesna) • 22 (t. przewlekła)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą wczesną: 58,3%</li> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą przewlekłą: 18,2%</li> </ul>	[8]
GRA7				<ul style="list-style-type: none"> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą wczesną: 75%</li> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą przewlekłą: 36,3%</li> </ul>	
MIC3	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną GST	Awidność IgG	121 prób pochodzących od 80 kobiet ciężarnych pobranych w różnym czasie od serokonwersji	<ul style="list-style-type: none"> <li>• niska awidność przeciwciał IgG w próbach surowic pochodzących od kobiet ciężarnych w dwóch pierwszych miesiącach zarażenia <i>T. gondii</i></li> </ul>	[9]
GRA7	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną His-Tag	IgG ELISA	117 prób: • 45 (t. wczesna) • 72 (t. przewlekła)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą wczesną: 95,9%</li> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą przewlekłą: 68,9 %</li> </ul>	[10]
GRA6	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną His-Tag	IgG ELISA	90 prób: • 33 (t. wczesna) • 57 (t. przewlekła)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą wczesną: 95,9%</li> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą przewlekłą: 68,9 %</li> </ul>	[11]
P35 (GRA8)				<ul style="list-style-type: none"> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą wczesną: 95,9%</li> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą przewlekłą: 68,9 %</li> </ul>	
MAG1	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną His-Tag	IgG ELISA	117 prób: • 37 (t. wczesna) • 80 (t. przewlekła)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą wczesną: 97,3%</li> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą przewlekłą: 7,5 %</li> </ul>	[12]
ROP1	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną His-Tag	IgG ELISA	127 prób: • 37 (t. wczesna) • 90 (t. przewlekła)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą wczesną: 94,6%</li> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą przewlekłą: 15,5 %</li> </ul>	[13]#
GRA2				<ul style="list-style-type: none"> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą wczesną: 100%</li> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą przewlekłą: 22,5 %</li> </ul>	
SAG2A	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną His-Tag	IgG ELISA	60 prób: • 30 (t. wczesna) • 30 (t. przewlekła)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą wczesną: 90%</li> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą przewlekłą: 67 %</li> </ul>	[14]
GRA2	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną TRX i domeną His-Tag	IgG ELISA	59 prób pochodzących z Francji: • 24 (t. wczesna) • 35 (t. przewlekła)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą wczesną: 95,8%</li> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą przewlekłą: 67,7 %</li> </ul>	[15]
			46 prób pochodzących z Iranu: • 18 (t. wczesna) • 28 (t. przewlekła)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą wczesną: 100%</li> <li>• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą przewlekłą: 71,4 %</li> </ul>	

\* – faza choroby, dla której charakterystyczne są badane surowice; # – źródło finansowania badań, grant Narodowej Fundacji Polpharmy pt. „Konstrukcja serologicznych zestawów diagnostycznych do wykrywania oraz różnicowania toksoplazmozy wczesnej i przewlekłej”.



**Rycina 1.** Porównanie reaktywności w teście IgG ELISA poliwalentnego antygeny natywnego (A) oraz dwóch antygenów rekombinantowych: GRA2 (B) i ROP1 (C) z pulą 37 surowic pobranych od pacjentów z wczesną fazą choroby oraz pulą 90 surowic przewlekłych. Jasne części walców oznaczają wyniki pozytywne uzyskane dla każdej puli surowic.

w organizmie żywiciela (w miarę rozwoju odpowiedzi immunologicznej) ulegają konwersji z form aktywnych, szybko namnażających się tachyzoitów w uśpione bradyzoity, które gromadzą się w cystach lokalizowanych np. w mięśniach szkieletowych, mięśniu serca, oku czy też mózgu. Te formy rozwojowe pasożyta różnią się produkowanymi antygenami (wydzielniczymi, powierzchniowymi, cytoplazmatycznymi oraz enzymami), co skutkuje obecnością w organizmie żywiciela różnych przeciwciał antybiałko w różnym czasie trwania choroby. Oczywiście jest to sytuacja bardzo korzystna i pożądana w przypadku poszukiwania tzw. molekularnych markerów, które specyficznym reagują z immunoglobulinami z wczesnej bądź przewlekłej fazy choroby. Ponadto pewne antygeny, w zależności od ich lokalizacji w komórce pasożyta oraz pełnionej w niej funkcji, są bardzo słabo ekspozowane układowi immunologicznemu. Z tego powodu w surowicy danego pacjenta specyficzne IgG, rozpoznające dane białko mogą występować na bardzo niskim poziomie. Zatem aby opracować test diagnostyczny oparty na metodzie ELISA, który rozpoznawał będzie

wszystkie przypadki toksoplazmozy z taką samą czułością jak antygen natywny (będący podstawą testów dostępnych obecnie na rynku), należy stworzyć odpowiednie mieszanki białek rekombinantowych. Przeprowadzone przez nas badania wykazały, iż opłaszczenie jednej studzienki na płycie ELISA mieszanką trzech białek antygenowych zwiększa czułość oznaczenia w porównaniu do testu, w którym zastosowano jedynie pojedynczy antygen lub mieszankę dwóch białek rekombinantowych [16]. Stosowanie mieszanki trzech białek przede wszystkim umożliwia detekcję przeciwciał klasy IgG anty-*T. gondii*, które zawarte są w surowicach pacjentów z przewlekłą fazą choroby. Miano specyficznych IgG w próbach takich surowic jest najczęściej bardzo niskie, przez co ich detekcja z wykorzystaniem pojedynczego antygeny jest utrudniona. Z tego względu zastosowanie mieszanki trzech odpowiednio dobranych białek antygenowych zwiększa znacznie czułość oznaczenia. Wyniki porównujące reaktywność sześciu mieszanek złożonych odpowiednio z trzech lub dwóch różnych białek rekombinantowych *T. gondii* (MAG1, GRA2, ROP1, SAG1 oraz GRA5) przedstawiono w Tabeli 3. Analizując uzyskane rezultaty można zaobserwować, iż mieszanki zawierające trzy antygeny (MAG1+SAG1+GRA5; GRA2+SAG1+GRA5 oraz ROP1+SAG1+GRA5) wykazują większą czułość w teście ELISA niż odpowiednie koktajle dwóch białek antygenowych. Większa reaktywność mieszanek złożonych z trzech antygenów jest szczególnie widoczna w przypadku zastosowania puli surowic pobranych od pacjentów z przewlekłą fazą choroby. Reaktywność mieszanki zawierającej dwa białka (MAG1+SAG1) dla tej puli surowic po dodaniu trzeciego antygeny (GRA5) wzrosła z 79,2% do 93%. W przypadku mieszanki GRA2+SAG1 dodatek GRA5 spowodował wzrost reaktywności z 86,8% do 92,4%, natomiast dla mieszanki ROP1+SAG1 wzrost z 86,8% do 94,4%, dzięki czemu uzyskano czułość testu porównywalną lub nawet wyższą niż dla TLA.

Konstrukcja mieszanki rekombinantowych białek antygenowych do wykrywania przeciwciał antytoksoplazmowych w surowicach chorych pacjentów, która mogłaby zastąpić TLA, niewątpliwie wymaga doboru odpowiednich antygenów. TLA jest lizatem białkowym otrzymywanym z tachyzoitów, w skład którego wchodzi bardzo duża pula różnych białek sekrecyjnych, powierzchniowych oraz cytoplazmatycznych pasożyta. Z tego względu wśród puli antygenów rekombinantowych otrzymanych metodami inżynierii genetycznej, konieczne jest wyszukanie odpowiednich białek umożliwiających detekcję specyficznych przeciwciał z czułością porównywalną jaką uzyskuje się dla poliwalentnego antygeny natywnego (TLA). Z tego względu przy opracowywaniu

**Tabela 3.** Porównanie reaktywności TLA z reaktywnością mieszanek złożonych z dwóch / trzech białek rekombinantowych *T. gondii* w teście IgG ELISA z wykorzystaniem puli 189 prób surowic pochodzących od pacjentów z wczesną, podostrą i przewlekłą fazą choroby [16].

Grupa surowic	TLA/mieszanka antygenów	Ilość wyników pozytywnych (%)	Wartości absorbancji	
			Średnia	Zakres
Ostra toksoplazmoza n=27	TLA	26 (96,3)	1,126	0,415–2,445
	MAG1+SAG1+GRA5	26 (96,3)	1,170	0,439–2,71
	MAG1+SAG1	26 (96,3)	0,997	0,292–2,58
	GRA2+SAG1+GRA5	25 (92,6)	1,064	0,374–1,831
	GRA2+SAG1	23 (85,2)	1,144	0,296–2,016
	ROP1+SAG1+GRA5	25 (92,6)	1,594	0,487–3,209
	ROP1+SAG1	24 (88,9)	1,380	0,441–2,677
Podostra toksoplazmoza n=18	TLA	17 (94,4)	0,932	0,443–2,454
	MAG1+SAG1+GRA5	15 (83,3)	0,836	0,48–2,154
	MAG1+SAG1	15 (83,3)	0,620	0,207–1,913
	GRA2+SAG1+GRA5	18 (100,0)	0,955	0,523–1,648
	GRA2+SAG1	15 (83,3)	0,99	0,376–1,804
	ROP1+SAG1+GRA5	17 (94,4)	1,145	0,655–2,46
	ROP1+SAG1	17 (94,4)	1,173	0,0589–2,096
Chroniczna toksoplazmoza n=144	TLA	135 (93,7)	1,356	0,312–1,78
	MAG1+SAG1+GRA5	134 (93)	0,918	0,28–2,476
	MAG1+SAG1	114 (79,2)	0,839	0,225–2,292
	GRA2+SAG1+GRA5	133 (92,4)	0,918	0,329–2,34
	GRA2+SAG1	125 (86,8)	1,059	0,193–2,549
	ROP1+SAG1+GRA5	136 (94,4)	1,227	0,28–2,827
	ROP1+SAG1	125 (86,8)	1,099	0,355–2,539
Razem n=189	TLA	178 (94,2)	1,288	0,382–2,488
	MAG1+SAG1+GRA5	175 (92,6)	0,948	0,28–2,71
	MAG1+SAG1	155 (82)	0,837	0,207–2,58
	GRA2+SAG1+GRA5	176 (93,1)	0,943	0,329–2,34
	GRA2+SAG1	163 (86,2)	1,06	0,193–2,549
	ROP1+SAG1+GRA5	178 (94,2)	1,267	0,28–3,209
	ROP1+SAG1	166 (87,8)	1,143	0,355–2,677

n – ilość przebadanych surowic seropozytywnych

prototypu nowego testu diagnostycznego, opartego na mieszance białek rekombinantowych, nasz zespół badawczy kierował się wyborem jednego antygeny, który charakteryzował się wysoką reaktywnością z przeciwciałami zawartymi w surowicach zarówno z fazy wczesnej jak i przewlekłej toksoplazmozy (np. SAG1, dla którego w badaniach uzyskano reaktywność prawie 100%). Kolejnym składnikiem opracowanych mieszanek był zawsze marker molekularny fazy wczesnej (np. białko MAG1, ROP1, GRA2, P35 lub GRA7). Tak skonstruowane mieszanki, przetestowane na znacznej puli surowic pobranych od pacjentów chorych na toksoplazmozę wczesną, czy też przewlekłą, charakteryzowały się bardzo wysoką czułością (przekraczającą 90%), porównywalną z TLA (Tabela 4). W literaturze światowej w ciągu ostatniej dekady pojawiły się także

doniesienia o opracowaniu innych mieszanek białek rekombinantowych, które mogłyby znaleźć zastosowanie w serodiagnostyce toksoplazmozy. W 2000 roku, Aubert i wsp. [18] przedstawili użyteczność mieszanki zawierającej białka GRA7, GRA8 oraz ROP1 do wykrywania przeciwciał antytoksoplazmowych klasy IgM. W tym samym roku przebadano także przydatność diagnostyczną dwóch mieszanek antygenów rekombinantowych: GRA7 + GRA8 + SAG1 (19), GRA7 + GRA8 + SAG2 + H4 [19] do wykrywania specyficznych IgG.

## WNIOSKI

Szybki postęp w technikach rekombinacji DNA, który umożliwił konstrukcję zróżnicowanych bakteryjnych i eukariotycznych systemów ekspresji

Tabela 4. Mieszanki antygenów rekombinantowych *T. gondii* wykorzystywane w diagnostyce toksoplazmozy.

Mieszanka antygenów	System ekspresyjny/białko	Wykrywane przeciwciała/test diagnostyczny	Ilość przebadanych surowic pozytywnych (*)	Wyniki	Literatura#
SAG1 GRA1 GRA7	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną His-Tag	IgG ELISA	241 próby: • 117 (t. wczesna) • 124 (t. przewlekła)	• czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą wczesną: 100% • czułość testu dla grupy surowic z toksoplazmozą przewlekłą: 91.1%	[10]
P35 (GRA8) SAG2 GRA6	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną His-Tag	IgG ELISA	72 próby surowic (t. przewlekła)	• czułość testu: 88,9% • specyficzność testu: 100%	[17]
MIC1ex2 MAG1 MIC3				• czułość testu: 94,4% • specyficzność testu: 100%	
MAG1 SAG1 GRA5	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną His-Tag	IgG ELISA	189 prób: • 27 (t. wczesna) • 18 (t. podostra) • 144 (t. przewlekła)	• czułość testu: 92,6% • specyficzność testu: 100%	[16]#
GRA2 SAG1 GRA5				• czułość testu: 93,1% • specyficzność testu: 100%	
ROP1 SAG1 GRA5				• czułość testu: 94,2% • specyficzność testu: 100%	

(\*) – faza choroby, dla której charakterystyczne są badane surowice; # – źródło finansowania badań, grant Naukowej Fundacji Polpharmy pt. „Konstrukcja serologicznych zestawów diagnostycznych do wykrywania oraz różnicowania toksoplazmozy wczesnej i przewlekłej”.

genów, dał możliwość otrzymywania dużej ilości różnych białek. Obecnie na rynku dostępny jest bardzo szeroki wybór wektorów ekspresyjnych, które dzięki wyselekcjonowanym, dobrze regulowanym i bardzo silnym promotorom umożliwiają ogromną nadprodukcję białek (stanowiącą od kilku do kilkudziesięciu procent ogólnej zawartości białek w komórce). Otworzyło to nową drogę do łatwej produkcji nowych narzędzi diagnostycznych, które dzięki swoim właściwościom mogą polepszyć i usprawnić wykrywanie wielu niebezpiecznych chorób. Antygeny rekombinantowe pasożyta *T. gondii*, produkowane w bakteryjnych lub eukariotycznych systemach ekspresyjnych, stanowią zatem nową grupę odczynników immunodiagnostycznych. Odpowiednio wyselekcjonowane białka antygenowe pasożyta stały się podstawą do opracowania prototypów nowych testów diagnostycznych umożliwiających nie tylko rozpoznawanie toksoplazmozy, ale także (i co ważniejsze) różnicowanie faz choroby. Z całą pewnością należy stwierdzić, iż wytypowanie

odpowiednich antygenów, a następnie konstrukcja nowych testów serodiagnostycznych mają bardzo duże znaczenie nie tylko poznawcze, ale przede wszystkim aplikacyjne. Wprowadzenie do diagnostyki toksoplazmozy nowych, tańszych w produkcji oraz lepiej wystandaryzowanych zestawów opartych na białkach rekombinantowych pasożyta może pozwolić na upowszechnienie badań diagnostycznych. Jest to szczególnie istotne dla kobiet ciężarnych, u których w przypadku pierwotnego kontaktu z pasożytem istnieje możliwość zarażenia płodu. Ze względu na możliwość leczenia ciężarnej i tym samym zapobiegania toksoplazmozie wrodzonej, ważne jest wprowadzenie badań przesiewowych, które naszym zdaniem mogą być bardziej dostępne jeżeli będą tańsze. Reasumując należy stwierdzić, że wyniki przeprowadzonych badań dotyczących zastosowania antygenów rekombinantowych w serodiagnostyce toksoplazmozy są bardzo obiecujące, co stwarza nadzieje na możliwie szybkie wdrożenie nowych testów.

#### Piśmiennictwo:

- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA: Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev, 1998; 11: 267–99
- Dubremetz JF: Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Trends Microbiol, 1998; 6: 27–30
- Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM: *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol, 2000; 30: 1217–58
- Boyer KM: Congenital toxoplasmosis: current status of diagnosis, treatment, and prevention. Semin Pediatr Infect Dis, 2000; 11: 167–71



5. Pinard JA, Leslie NS, Irvine PJ: Maternal serologic screening for toxoplasmosis. *J. Midwifery Womens Health*, 2003; 48: 308–16
6. Liesenfeld O, Montoya JG, Tathineni NJ i wsp.: Confirmatory serologic testing for acute toxoplasmosis and rate of induced abortions among women reported to have positive *Toxoplasma* immunoglobulin M antibody titers. *Am J Obstet Gynecol*, 2001; 184: 140–45
7. Suzuki Y, Ramirez R, Press C i wsp.: Detection of immunoglobulin M antibodies to P35 antigen of *Toxoplasma gondii* for serodiagnosis of recently acquired infection in pregnant women. *J Clin Microbiol*, 2000; 38: 3967–70
8. Nigro M, Gutierrez A, Hoffer AM, Clemente i wsp.: Evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003; 47: 609–13
9. Beghetto E, Buffolano W, Spadoni A i wsp.: Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *J Clin Microbiol*, 2003; 41: 5414–18
10. Pietkiewicz H, Hiszczyńska-Sawicka E, Kur J i wsp.: Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*, 2004; 42: 1779–81
11. Hiszczyńska-Sawicka E, Kur J, Pietkiewicz H i wsp.: Efficient production of the *Toxoplasma gondii* GRA6, p35 and SAG2 recombinant antigens and their applications in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Acta Parasitol*, 2005; 50: 249–54
12. Holec L, Hiszczyńska-Sawicka E, Gąsior A i wsp.: Use of MAG1 recombinant antigen for detection of *Toxoplasma gondii* infection in humans. *Clin Vaccine Immunol*, 2007; 14: 220–25
13. Holec-Gąsior L, Kur J, Hiszczyńska-Sawicka E: GRA2 and ROP1 recombinant antigens as potential markers for detection of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G in human with acute toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol*, 2009; 16: 510–14. *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*
14. Béla SR, Oliveira Silva DA, Cunha-Júnior JP i wsp.: Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008; 62: 245–54
15. Golkar M, Rafati S, Abdel-Latif MS i wsp.: The dense granule protein GRA2, a new marker for the serodiagnosis of acute *Toxoplasma* infection: comparison of sera collected in both France and Iran from pregnant women. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007; 58: 419–26
16. Holec-Gąsior L, Kur J: *Toxoplasma gondii*: Recombinant GRA5 antigen for detection of immunoglobulin G antibodies using enzyme-linked immunosorbent assay. *Exp Parasitol*, 2010; 124: 272–79. *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*
17. Holec L, Gąsior A, Brillowska-Dąbrowska A i wsp.: *Toxoplasma gondii*: Enzyme-linked immunosorbent assay using different fragments of recombinant microneme protein (MIC1) for detection of immunoglobulin G antibodies. *Exp Parasitol*, 2008; 119: 1–6
18. Aubert D, Maine GT, Villena I i wsp.: Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol*, 2000; 38: 1144–50
19. Li S, Galvan G, Araujo FG i wsp.: Serodiagnosis of recently acquired *Toxoplasma gondii* infection using an enzyme-linked immunosorbent assay with a combination of recombinant antigens. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000; 7: 781–87

# Czy możliwe jest wykrywanie patologii układu krążenia płodu w pierwszym trymestrze ciąży?

Is it possible to identify pathology of the fetal cardiovascular system in the first trimester of pregnancy?

Joanna Dangel,  
Paweł Własienko

Poradnia Perinatologii i Kardiologii Perinatalnej, II Klinika Położnictwa i Ginekologii,  
Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2003 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem dr hab. Joanny Dangel grant na realizację projektu badawczego pt. *Ocena przydatności badania echokardiograficznego płodu w pierwszym i na początku drugiego trymestru ciąży.*

## Streszczenie

Patologie układu krążenia są najczęstszymi wadami wrodzonymi, występującymi z częstością ok. 1% wśród żywo urodzonych noworodków. U płodów 3 do 5 razy częściej. Mogą doprowadzać do niewydolności serca i być przyczyną zgonu wewnątrzmacicznego. Jednak wiele krytycznych wad serca nie doprowadza do zaburzeń rozwoju wewnątrzłonowego, a objawy kliniczne u noworodka są niejednoznaczne, co może doprowadzić do opóźnienia koniecznej interwencji lub zgonu dziecka przed podjęciem leczenia. Wszystkie te aspekty wpłynęły na dynamiczny rozwój prenatalnej diagnostyki kardiologicznej.

Dzięki rozwojowi technicznemu obecnie możliwa jest już ocena budowy i funkcji płodowego układu krążenia od 11 tygodnia ciąży. Przedstawione wyniki badań są pionierską pracą w naszym kraju. W okresie realizowania projektu badawczego byliśmy pierwszym zespołem, który systematycznie wdrażał diagnostykę kardiologiczną płodów w I trymestrze ciąży. Na podstawie badań echokardiograficznych płodów wykonanych u 1170 płodów stwierdzono, że możliwa jest skuteczna diagnostyka układu krążenia od 11 tygodnia ciąży. Podstawowy obraz 4 jam serca oceniono u 93% płodów, a odejście wielkich pni tętniczych u 80%. Opracowano własne normy wskaźnika sprawności mięśnia sercowego (Tei-index) dla I trymestru ciąży. Prace rozpoczęte w ramach realizacji projektu badawczego są kontynuowane przez dr Pawła Własienko, który kończy przewód doktorski na ten temat. Opracowaliśmy wskazania do badania echokardiograficznego płodu w I trymestrze ciąży. W naszym ośrodku każdy płód badany między 11 a 14 tygodniem ciąży ma wstępnie oceniony układ krążenia.

Wpłynęło: 24-02-2011  
Zaakceptowano: 25-02-2011  
Opublikowano: 30-03-2011

Przeprowadzone badania jednoznacznie wykazały, że ocena serca i układu krążenia w I trymestrze ciąży jest możliwa i przydatna. Pozwala na poszerzenie diagnostyki, śledzenie dynamiki zmian i zapewnienie dla matki i dziecka optymalnej opieki okołoporodowej.

**Adres do korespondencji:**  
dr hab. n. med. Joanna  
Dangel, Poradnia Perinatologii  
i Kardiologii Perinatalnej,  
II Klinika Położnictwa  
i Ginekologii, Warszawski  
Uniwersytet Medyczny,  
ul. Karowa 2, 00-315  
Warszawa, e-mail:  
joanna.dangel@wum.edu.pl

**Słowa kluczowe:** diagnostyka prenatalna • echokardiografia płodowa • płód • pierwszy trymestr ciąży

## Summary

Cardiovascular system abnormalities are the most common inherited defects occurring in about 1% of life-born neonates, 3–5 times more often in fetuses. They can cause a fetal heart failure and intrauterine death, however the critical heart defects do not cause any prenatal problems. As the clinical signs and symptoms after delivery are not obvious, neonates with critical congenital heart defects can be discharged home as healthy babies. Diagnosis is postponed, and sometimes children die before treatment is introduced.

High quality ultrasound machines enable to evaluate fetal cardiovascular system from 11th week of pregnancy. We were the first team to start to assess fetal cardiovascular system in the first trimester of pregnancy in the routine way. We performed fetal echocardiography examinations in 1170 fetuses between 11 and 13.6 week of pregnancy and we proved that anatomy and function can be evaluated in this period. Four chamber view was seen in 93% fetuses, great arteries in 80%. Normal values of Doppler Tei-index for the 1st trimester were established as well. The continuation of this project is dr Paweł Własienko doctor's thesis. We prepared indications for fetal heart evaluation in the first trimester. Each fetus examined in our center in the first trimester receives the routine evaluation of the circulatory system.

The project showed that it is possible to visualize fetal heart anatomy and assess function in the first trimester of pregnancy. The primary diagnosis can be established. Additional diagnostic tests can be ordered if necessary. We can examine the progression or regression of the pathology of the fetal cardiovascular system. In cases of abnormalities the optimal perinatal care is organized.

**Key words:** prenatal diagnosis • fetal echocardiography • fetus • first trimester ultrasound

## WSTĘP

---

Diagnostyka prenatalna jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin współczesnej medycyny. Jednym z najtrudniejszych do oceny elementów budowy płodu był i pozostaje układ krążenia, ze szczególnym uwzględnieniem anatomii i funkcji serca. Jednocześnie dane statystyczne wskazują, że to wady układu krążenia odpowiadają za największy odsetek zgonów wśród noworodków i niemowląt. Częstość występowania wad serca wynosi ok. 1% żywo urodzonych dzieci, jednak w okresie prenatalnym jest znacznie częstsza, szacowane jest, że około 3 do 5 razy.

Prenatalne rozpoznanie wad serca może w istotny sposób poprawić rokowanie dla małego pacjenta, ze względu na możliwość zaplanowania czasu, miejsca i ośrodka porodu oraz przygotowanie zespołu medycznego na narodziny pacjenta z krytyczną wadą układu krążenia. Ogromny postęp jaki dokonał się od końca lat 80. XX wieku do dnia dzisiejszego pozwolił na przekroczenie kolejnych diagnostycznych barier. W chwili obecnej diagnostyka wad układu krążenia płodu odbywa się najczęściej po 20 tygodniu ciąży, w trakcie drugiego rutynowego badania

przesiewowego wykonywanego przez lekarzy położników. W niektórych patologiach zarówno strukturalnych [1], jak i czynnościowych [2], istnieją możliwości skutecznego leczenia prenatalnego, również w naszym kraju.

Ośrodki referencyjne kardiologii płodowej rozpoczęły badania nad możliwością wcześniejszej oceny układu krążenia płodu, ze szczególnym uwzględnieniem okresu pomiędzy 11,0 a 13,6 tygodniem ciąży, kiedy wykonywane jest pierwsze ultrasonograficzne badanie przesiewowe z oceną przezierności karku (nuchal translucency – NT) [3–5]. W Polsce te pionierskie prace rozpoczął zespół kierowany przez dr hab. n. med. Joannę Dangel już w 2003 roku. Były one możliwe dzięki otrzymaniu funduszy na realizację projektu badawczego pt: „Ocena przydatności badania echokardiograficznego płodu w pierwszym i na początku drugiego trymestru ciąży” od Naukowej Fundacji Polpharmy.

Podstawowym celem projektu było stworzenie powszechnego, ambulatoryjnego systemu wykrywania patologii płodu w pierwszym i na początku drugiego trymestru ciąży. Badania miały również

odpowiedzieć na pytanie o możliwość wykrywania patologii układu krążenia płodu już na tak wczesnym etapie jak pierwszy trymestr ciąży. Dzięki realizacji tego projektu ukazały się pierwsze prace w Polsce poświęcone temu zagadnieniu [6,7], uzupełnione wkrótce doświadczeniami innych ośrodków kardiologii płodowej [8].

W Polsce obecnie w każdym z referencyjnych ośrodków kardiologii płodowej przeprowadzana jest ocena układu krążenia płodu już od I trymestru ciąży. Najnowsze doniesienia ukazały się w ostatnich latach. Pierwsza publikacja – powstała w ramach omawianego w tej pracy projektu naukowego – wykazała jednoznacznie możliwość oceny budowy serca płodu w I trymestrze ciąży w referencyjnym ośrodku kardiologii płodowej [9]. Druga praca, z ośrodka w Rudzie Śląskiej, podała zakresy wartości referencyjnych parametrów ocenianych w badaniu echokardiograficznym w I trymestrze ciąży [10].

## WYNIKI

Realizując projekt badawczy pt: „Ocena przydatności badania echokardiograficznego płodu w pierwszym i na początku drugiego trymestru ciąży” pomiędzy styczniem 2004 a końcem czerwca 2008 wykonano 1170 badań echokardiograficznych u płodów pomiędzy 11,0 a 13,6 tygodniem ciąży, przy długości głowowo – ciemieniowej (crown-rump length CRL) od 45mm do 85 mm (Rycina 1). Badania wykonywano aparatem Sequoia 713 Siemens, a od 2006 roku również Voluson Expert 730 GE.



**Rycina 1.** Długość ciemieniowo-siedzeniowa (CRL = 77,9 mm) płodu w 13 tygodniu ciąży.

Średni wiek pacjentek zgłaszających się na badanie echokardiograficzne w I trymestrze ciąży wynosił 30 lat (SD 4,5, Min 17, Max 43). 237 (20%) pacjentek miało powyżej 35 lat. Najczęstszymi przyczynami skierowań były: wiek matki >35 lat (20%), poszerzona przezierność karku (NT – *nuchal translucency* 8%), wada wrodzona serca u rodzeństwa (7%), cukrzyca

insulinozależna u matki (7%) oraz obciążony wywiad położniczy (4%). W trakcie trwania badania obserwowano procentowy spadek liczby pacjentek z cukrzycą insulinozależną oraz systematyczny wzrost liczby pacjentek kierowanych z powodu zaobserwowania nieprawidłowej wartości przezierności karkowej (NT) w przesiewowym badaniu położniczym.

U 155 pacjentek (na 163 skierowane) wykonane zostały dodatkowo biochemiczne testy przesiewowe I trymestru (tzw. test PAPP-A) oceniające stężenie białka PAPP-A oraz  $\beta$ HCG. Były to pierwsze tego typu badania przeprowadzane w naszym kraju, obecnie jest to zalecane badanie u kobiet z grup podwyższonego ryzyka w ramach Programu Badań Prenatalnych finansowanego przez NFZ. W grupie tej w 31 przypadkach oznaczono kariotyp, stwierdzając w 1 przypadku monosomię X (zgon wewnątrzmaciczny), w 1 przypadku 46, XY del 6q (terminacja), oraz 4 przypadki trisomii chromosomu 21 (1 terminacja, 3 żywo urodzone). NT >95 centyla stwierdzono u 31 (20%) pacjentek.

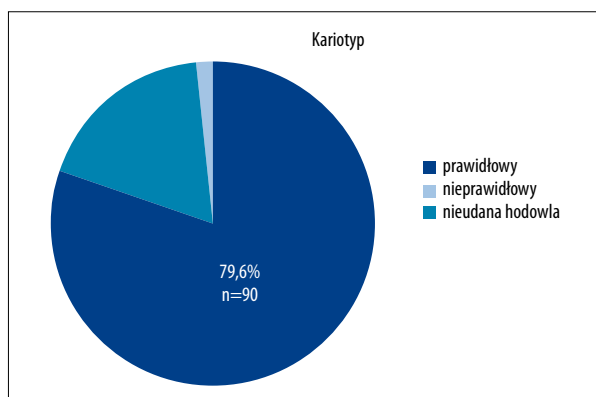
W 27 przypadkach (17%) wynik testu przesiewowego I trymestru (NT + PAPP-A) był nieprawidłowy. W 18 (66%) przypadkach stwierdzono NT >95 centyla. Wśród płodów z nieprawidłowym kariotypem (u pacjentek, u których wykonano test PAPP-A) wynik badania był nieprawidłowy w 5 przypadkach (83%). W grupie tej były 3 terminacje (nieprawidłowy kariotyp – 2, częściowy zaśniad groniasty – 1) oraz 4 zgony wewnątrzmaciczne (NIHF – 3, zgon w 16 tyg. – 1) (26%). W 2 przypadkach pacjentki nie zgłosiły się na badanie kontrolne.

Znaczące podwyższenie ryzyka po wykonaniu testu biochemicznego wystąpiło w 18 przypadkach, u 16 był nieprawidłowy wynik testu biochemicznego, u 2 – graniczny (ryzyko T21 1:298 oraz 1:304). NT >95 centyla stwierdzono w tej grupie u 7 pacjentek, były to inne przypadki niż te z nieprawidłowym wynikiem testu biochemicznego, u których pomiary NT były prawidłowe. W grupie tej były 2 terminacje ciąży oraz 4 zgony wewnątrzmaciczne.

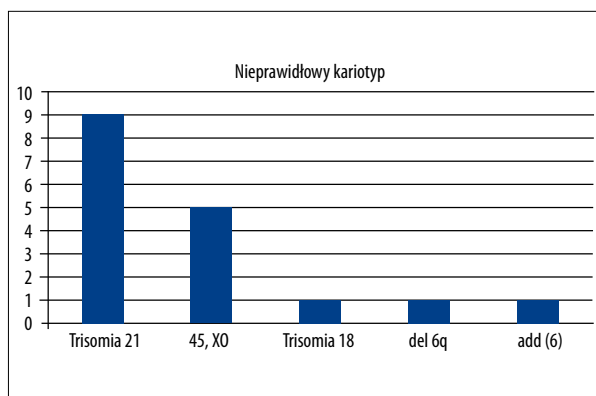
W całej badanej grupie kariotyp oznaczono u 113 płodów. W 90 (79,6%) przypadkach wynik był prawidłowy, w 17 (15%) nieprawidłowy, w 2 przypadkach nie udało się hodowla komórek, w 4 przypadkach nie jest znany (Wykres 1).

Wśród nieprawidłowych kariotypów stwierdzono (Wykres 2):

– w 9 przypadkach trisomię chromosomu 21 (6 terminacji, 3 żywo urodzone),



**Wykres 1.** Wyniki kariotypu oznaczonego u 113 płodów. Nieprawidłowy u 15 płodów.



**Wykres 2.** Szczegółowe wyniki nieprawidłowych kariotypów u 15 płodów.

- w 5 przypadkach monosomię X (3 zgony wewnątrzmaciczne, 2 terminacje),
- w 1 przypadku trisomię chromosomu 18 (żywo urodzony, pod opieką Warszawskiego Hospicjum dla Dzieci),
- w 1 przypadku delecję długiego ramienia chromosomu 6 (del 6q) (terminacja),
- w 1 przypadku add (6) (terminacja).

Badanie w I trymestrze ciąży wykonywano zgodnie z zaleceniami Fundacji Medycyny Płodu (Fetal Medicine Foundation FMF) z Londynu. Średnia wartość długości ciemieniowo-siedzeniowej (CRL) w trakcie badania wynosiła 64,5 mm (SD 8,9, Min 45, Max 85), a średni wiek ciążowy 12,5 tygodnia ciąży. Średni rytm serca płodu w tym okresie wynosił 159 (SD 8,6, Min 49, Max 191). W trakcie badania u wszystkich płodów oceniano przezierność karkową (NT – nuchal translucency) oraz obecność kości nosowej. Dodatkowo w ramach oceny układu krążenia oceniano przepływ przez przewód żylny.

W badanej grupie w 88 (7,5%) przypadkach stwierdzono nieprawidłową wartość przezierności karkowej (powyżej 95 centyla dla danego wieku ciążowego). Brak kości nosowej w trakcie badania stwierdzono u 11 (1%) płodów. Nieprawidłowy

przepływ przez przewód żylny (wsteczna fala a) stwierdzono w 29 (2,5%) przypadkach.

#### Analiza wyników badań i losów płodów z poszerzoną przeziernością karkową (NT)

Przezierność karku jest uznanym w diagnostyce prenatalnej markerem wskazującym na wzrost ryzyka wystąpienia u badanego płodu aberracji chromosomowej, wady układu krążenia lub innych narządów oraz ryzyka zgonu wewnątrzmacicznego [11–15]. Z tego względu szczegółowej analizie poddano wyniki badań płodów, u których stwierdzono nieprawidłowe wartości NT przekraczające 95 centyl dla danego wieku ciążowego.

We własnym materiale w 88 przypadkach stwierdzono nieprawidłową wartość przezierności karkowej (NT >95 centyla dla danego wieku ciążowego). Średni wiek pacjentek zgłaszających się na badanie echokardiograficzne w tej grupie wynosił 29 lat (SD 4,8, Min 18, Max 42). 14 (20%) pacjentek miało powyżej 35 lat. Dane te zbliżone są do charakterystyki grupy wszystkich pacjentek diagnozowanych w trakcie tego projektu badawczego.

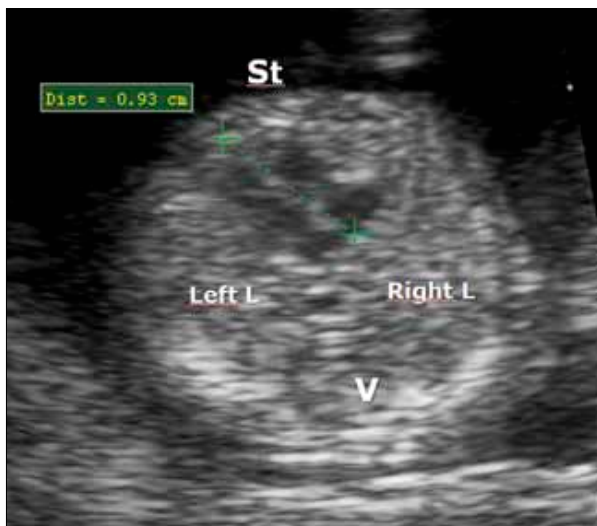
W większości przypadków przyczyną skierowania była nieprawidłowa wartość przezierności karkowej stwierdzona w przesiewowym badaniu położniczym. Drugą co do częstości przyczyną był nieprawidłowy wynik badania USG w I trymestrze ciąży.

Test PAPP-A został wykonany u 31 pacjentek z tej grupy, z czego w 18 (58%) przypadkach okazał się nieprawidłowy [16]. W grupie tej kariotyp był oznaczany w 52 przypadkach. W tej grupie znajdują się także wszystkie przypadki płodów z nieprawidłowym kariotypem, oprócz płodu z trisomią 18, którego NT mieściło się w granicach normy dla wieku ciążowego.

Średnia wartość długości ciemieniowo-siedzeniowej (CRL) w trakcie badania wynosiła 65,6 mm (SD 8,5, Min 45, Max 84), a średni wiek ciążowy 12,5 tygodnia ciąży. Średni rytm serca płodu w tym okresie wynosił 160 (SD 16,1, Min 49, Max 190).

Średnia wartość zmierzonej NT wynosiła 4mm (mediana: 3,2mm, SD 2,1mm, min 2,2mm, Max 14,3mm). W 6 (6,8%) przypadkach nie uwidoczniiono kości nosowej, w 13 (14,9%) przypadkach stwierdzono wsteczną falę a w DV, oraz w 16 (18,4%) przypadkach niedomykalność zastawki trójdzielnej.

W badanej grupie w 7 przypadkach doszło do zgonu wewnątrzmacicznego, a w 14 przypadkach ciąża została przerwana.



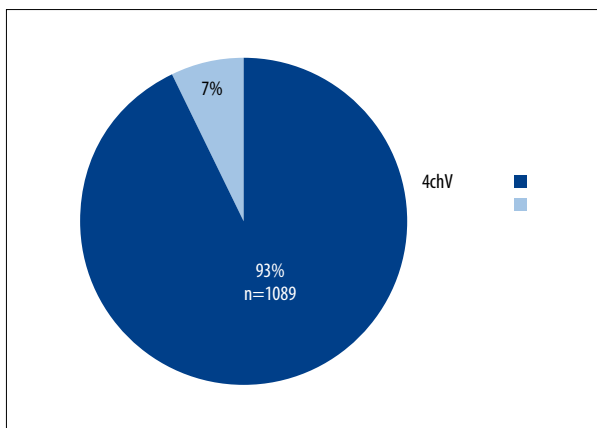
**Rycina 2.** Wielkość serca w 12 tygodniu ciąży, oś długa serca =9,3 mm (St – mostek; Left L – płuco lewe; Right L – płuco prawe; V – kręgosłup).

### Prenatalna ocena układu krążenia

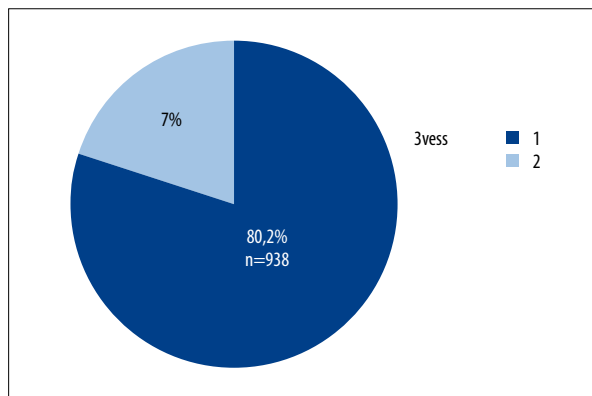
W trakcie wykonywanego w I trymestrze badania echokardiograficznego szczegółowo analizowano:

- położenie narządów w jamie brzusznej (situs),
- wielkość serca (Rycina 2),
- możliwość uwidocznienia prawidłowego obrazu 4 jam serca,
- możliwość uwidocznienia odejścia naczyń,
- charakter przepływu przez zastawkę trójdzielną,
- charakter przepływu przez przewód żylny.

Badanie echokardiograficzne przeprowadzono u 1170 płodów. Położenie narządów zostało ocenione w 96,8% przypadków, a wielkość serca została oceniona w 96,6%. Obraz 4 jam serca został uwidoczniony u 1089 płodów (93%) – Wykres 3, a odejście naczyń zostało ocenione u 938 płodów (80%) Wykres 4. Możliwość oceny anatomii serca wzrastała wraz z wiekiem ciążowym i zwiększaniem wymiarów poszczególnych struktur serca.



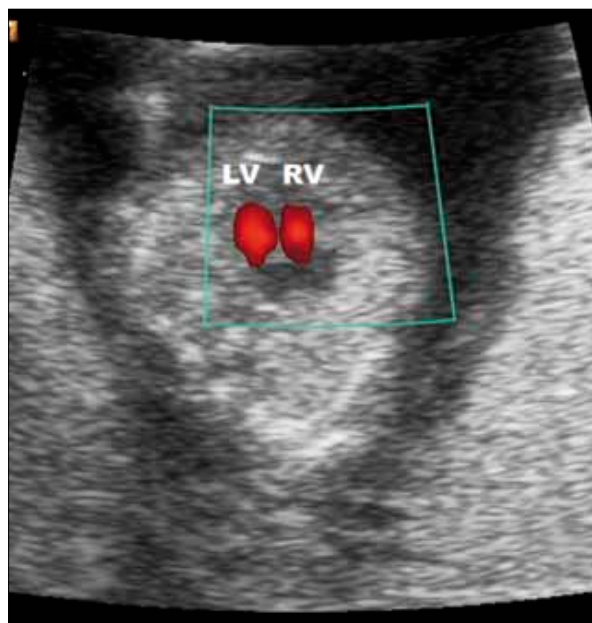
**Wykres 3.** Możliwość uwidocznienia obrazu 4 jam serca (4chV) podczas badania w I trymestrze ciąży.



**Wykres 4.** Możliwość oceny odejścia naczyń (3vess) podczas badania w I trymestrze ciąży.

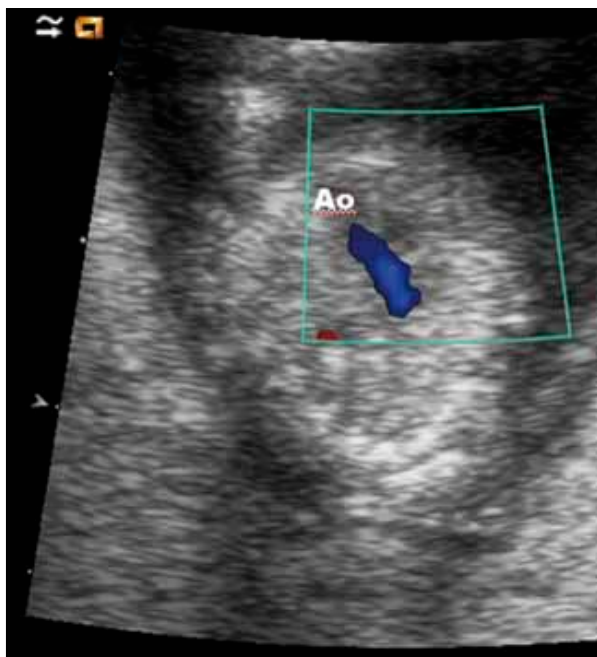


**Rycina 3.** Średnica zastawek przedsionkowo-komorowych u płodu w 12 tygodniu ciąży (zastawka mitralna, MV =1,9 mm; zastawka trójdzielnna, TV – 1,7 mm).

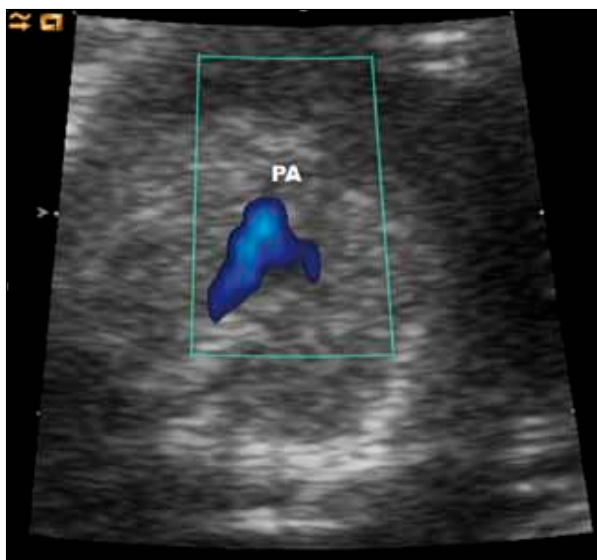


**Rycina 4.** Napływ do dwóch komór serca u płodu w 13 tygodniu ciąży (LV – lewa komora; RV – prawa komora).

Średnica zastawek przedsionkowo-komorowych wynosi w tym okresie około 2–3mm (Rycina 3). Nie zawsze możliwe jest uzyskanie satysfakcjonującego



Rycina 5. Droga odpływu z lewej komory u płodu w 13 tygodniu ciąży (Ao – aorta).



Rycina 6. Droga odpływu z prawej komory u płodu w 13 tygodniu ciąży (PA – tętnica płucna).

obrazu dwuwymiarowego. Wówczas niezmiernie pomocne jest badanie z zastosowaniem Dopplera znakowanego kolorem, dzięki czemu można precyzyjnie ocenić zarówno napływ do dwóch komór przez dwie zastawki przedsionkowo – komorowe (Rycina 4), jak i odejście z komór wielkich pni tętniczych (Ryciny 5, 6). Badanie znakowane kolorem umożliwia stwierdzenie skrzyżowania wielkich pni tętniczych, co wyklucza jedną z najczęstszych krytycznych wad wrodzonych serca, w której podstawowy obraz czterech jam serca jest prawidłowy, przełożenie wielkich pni tętniczych. Obraz ten jest łatwiejszy do interpretacji przy zastosowaniu kolorowego Dopplera, niż jedynie stosując badanie



Rycina 7. Średnica łuku aorty u płodu w 12 tygodniu ciąży (Ao = 0,9 mm).

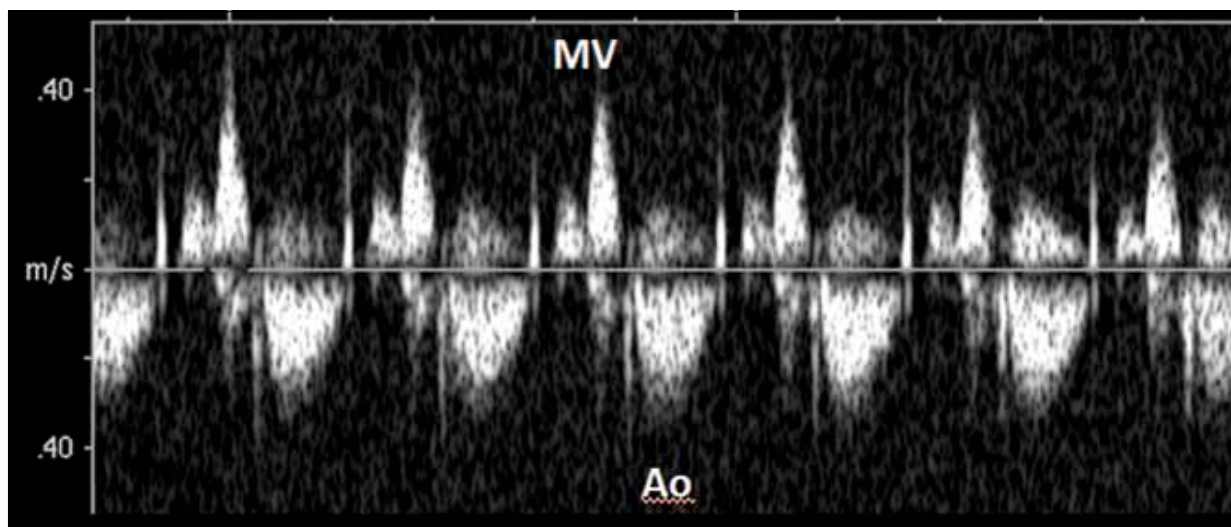


Rycina 8. Średnica pnia płucnego u płodu w 12 tygodniu ciąży (PA = 0,9 mm).

dwuwymiarowe w czasie rzeczywistym (Ryciny 7, 8).

U większości płodów zarejestrowano jednocześnie przepływ przez zastawkę mitralną i aortalną (Rycina 9). Jest to obraz konieczny dla obliczenia wskaźnika sprawności mięśnia sercowego (tzw. Tei-index), który ocenia globalną, tzn. skurczową i rozkurczową funkcję serca. Tei-index zaczęto obliczać od końca 2004 roku, zgodnie z zasadami bezpieczeństwa prenatalnych badań ultrasonograficznych – off-line, na podstawie danych uzyskanych w badaniu dopplerowskim [17]. Opracowano własne normy Tei-index dla płodów w I trymestrze ciąży. Dla lewej komory wartość Tei-index została obliczona u 210, a dla prawej komory u 151 płodów. Większość pomiarów została wykonana u płodów w 12 i 13 tygodniu ciąży. Wyniki w poszczególnych tygodniach nie różniły się między sobą i dlatego przedstawiono je jako obowiązujące dla całego I trymestru ciąży. Przedstawione są one w Tabeli 1.

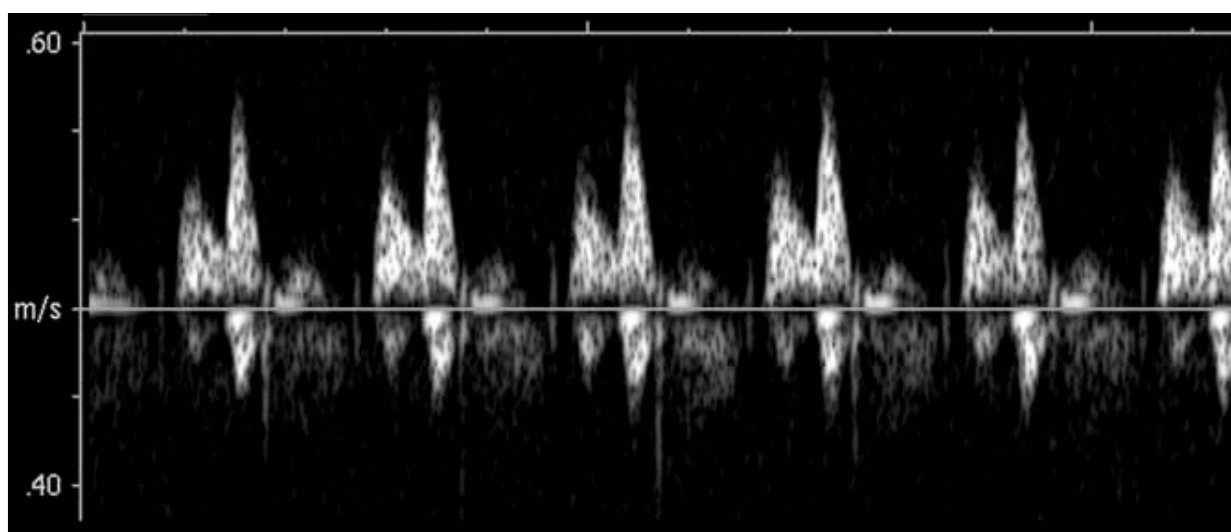
Prawidłowy przepływ przez zastawkę trójdzielną został potwierdzony u 85,1% przypadków (Rycina 10), a niedomykalność tej zastawki została stwierdzona



Rycina 9. Rejestracja przepływu przez zastawkę mitralną (MV) oraz aortalną (Ao) u 12 tygodniowego płodu.

Tabela 1. Zakresy wartości Tei-index u płodów w I trymestrze ciąży dla lewej (Tei LV) i prawej (Tei RV) komory.

	n	5. percentyl	50. percentyl	95. percentyl	Średnia	SD
Tei LV	210	0,297	0,411	0,560	0,417	0,074
Tei RV	151	0,244	0,390	0,548	0,394	0,087



Rycina 10. Prawidłowe spektrum przepływu przez zastawkę trójdzielną płodu w 13 tygodniu ciąży.

u 4,9% płodów (Rycina 11). Kontrolne badanie echokardiograficzne zostało wykonane u 73,8% pacjentek.

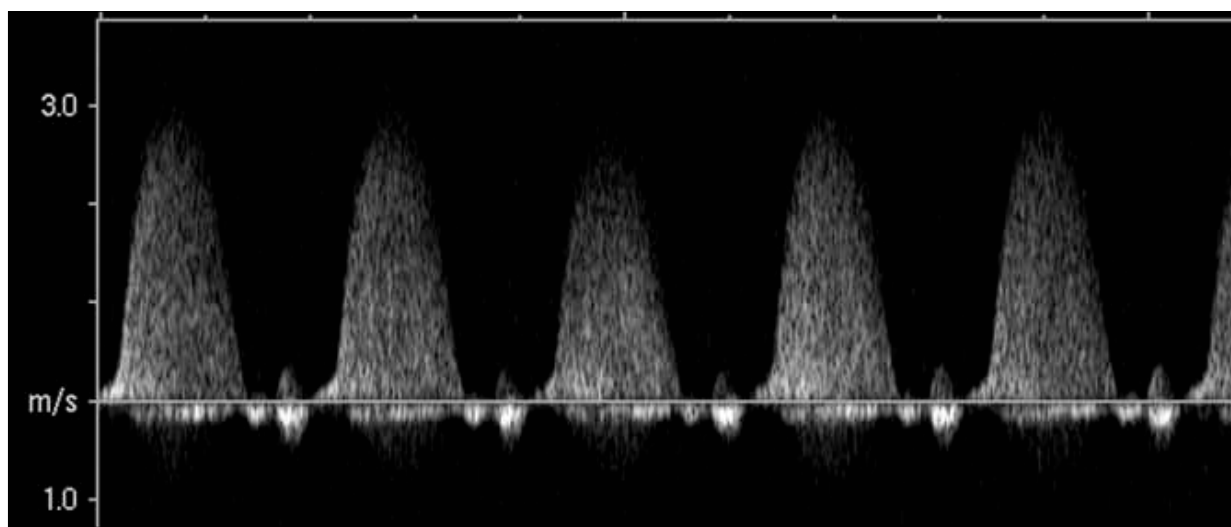
W trakcie trwania projektu wśród patologii układu krążenia wykrytych w I trymestrze ciąży stwierdzono m.in.:

- pentalogię Cantrella,
- zespół niedorozwoju lewego serca (HLHS),
- zespół lewego izomeryzmu z całkowitym blokiem przedsionkowo-komorowym,

- atreżę zastawki płucnej z ubytkiem w przegrodzie międzykomorowej,
- stenozę płucną u płodu z trisomią chromosomu 18 (w badaniu kontrolnym stwierdzono dodatkowo ubytek w przegrodzie międzykomorowej),
- wspólny kanał przedsionkowo-komorowy u płodu z trisomią chromosomu 21.

W 2 przypadkach ocena anatomiczna serca była niejednoznaczna – w zaplanowanym na 16/18





Rycina 11. Masywna holosystoliczna niedomykalność zastawki trójdzielnej u płodu ze stenozą płucną (13 tydzień ciąży).

tydzień badania kontrolnym w obu przypadkach zdiagnozowano zespół Fallota.

U 2 płodów zaobserwowano zaburzenia rytmu serca płodu:

- blok całkowity u płodu z zespołem lewego izomerizmu – kariotyp prawidłowy
- tachykardia u płodu z prawidłową anatomią układu krążenia i zespołem Turnera.

Oba płody obumarły wewnątrzmacicznie.

Uzyskane wyniki naszych badań jednoznacznie wskazują na możliwość oceny płodowego układu krążenia już od początku 11 tygodnia ciąży, w referencyjnych ośrodkach kardiologii płodowej.

W celu propagowania oceny układu krążenia w I trymestrze ciąży, w ramach realizacji projektu badawczego wydano płytę DVD z zasadami przeprowadzania badania w I trymestrze ciąży.

Po zakończeniu projektu prace nad diagnostyką układu krążenia w I trymestrze ciąży są kontynuowane w referencyjnym ośrodku kardiologii perinatalnej typu C w Warszawie. Na podstawie zdobytych doświadczeń ustalono obowiązujące wskazania do wczesnej diagnostyki układu krążenia, które przedstawiamy poniżej.

#### Wskazania do przeprowadzenia diagnostyki układu krążenia płodu w I trymestrze ciąży:

A. Wskazania płodowe:

- poszerzona przezierność karkowa stwierdzona podczas rutynowego badania przesiewowego,
- zaburzenia rytmu serca płodu,
- podejrzenie wady serca płodu,

- stwierdzona wada innego narządu,
- obrzęk uogólniony płodu.

B. Obciążony wywiad rodzinny:

- urodzenie poprzedniego dziecka z wadą wrodzoną serca,
- wada wrodzona serca występująca u jednego z rodziców,
- wada wrodzona serca w rodzinie.

C. Wskazania matczyne:

- cukrzyca insulinozależna,
- fenylketonuria,
- stosowanie w I trymestrze ciąży leków o znanym działaniu teratogennym.

Temat zapoczątkowany podczas realizacji projektu badawczego finansowanego przez Fundację jest kontynuowany przez lek. Pawła Własienkę, który kończy przewód doktorski w ramach studiów doktoranckich na Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Planowany termin obrony zaplanowano na początek 2011 roku.

#### PODSUMOWANIE

Uzyskane wyniki realizacji projektu badawczego finansowanego przez Fundację na Rzecz Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny jednoznacznie wykazały możliwość oceny płodowego układu krążenia w referencyjnych ośrodkach kardiologii płodowej już od początku 11 tygodnia ciąży. Przy stwierdzeniu nieprawidłowej budowy serca, nawet przy prawidłowym wyniku badań przesiewowych, tzn. NT i kości nosowej, należy wykonać badania inwazyjne, które umożliwiają poznanie przyczyny nieprawidłowej anatomii płodu i umożliwiają udzielenie pacjentce rzetelnej konsultacji.

Wyniki te przyczyniły się do opracowania wytycznych postępowania diagnostyczno-terapeutycznego we wczesnej diagnostyce prenatalnej układu krążenia u płodów, ze szczególnym uwzględnieniem konieczności wykonywania badań echokardiograficznych u płodów ze stwierdzoną w badaniu przesiewowym poszerzoną przeziernością karkową (NT).

W chwili obecnej w ośrodku referencyjnym program wczesnej diagnostyki prenatalnej umożliwia w kobiet z grup wysokiego ryzyka (np.: poprzednie dziecko z krytyczną wadą serca) wykluczenie istotnych patologii układu krążenia już ok. 12 tygodnia ciąży.

Dzięki otrzymaniu funduszy z Naukowej Fundacji Polpharmy nasz ośrodek był pierwszym, który systematycznie rozpoczął badanie układu krążenia płodów w I trymestrze ciąży.

#### **Pozostałe osoby biorące udział w realizacji projektu badawczego:**

dr n. med. Anita Hamela-Olkowska, lek. Katarzyna Jalinik, lek. Tomasz Roszkowski (analiza testów biochemicznych).

#### **Piśmiennictwo:**

1. McElchinney, Tworetzky W, Lock J: Current status of fetal cardiac intervention. *Circulation*, 2010; 121: 1256–63
2. Hamela-Olkowska A, Szymkiewicz-Dangel J: Tachyarytmie u płodów – aktualny stan wiedzy. *Ginekol Pol*, 2010; 81: 844–50
3. Carvalho JS, Moscoso G, Ville Y: First-trimester transabdominal fetal echocardiography. *Lancet*, 1998; 351: 1023–27
4. Huggon IC, Ghi T, Cook AC i wsp.: Fetal cardiac abnormalities identified prior to 14 weeks' gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2002; 20: 22–29
5. Carvalho JS: Fetal heart scanning in the first trimester. *Prenat Diagn*, 2004; 24: 1060–67
6. Szymkiewicz-Dangel J, Hamela-Olkowska A, Strzyżewski W i wsp.: Ocena anatomii serca płodu na przełomie pierwszego i drugiego trymestru ciąży – doniesienie wstępne. *Ginekol Pol*, 2003; 74(10): 1294–301
7. Szymkiewicz-Dangel J, Hamela-Olkowska A, Lipiński T i wsp.: Ocena anomalii u płodu na przełomie pierwszego i drugiego trymestru ciąży – doniesienie wstępne. *Ginekol Pol*, 2003. *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*
8. Kaczmarek P, Respondek-Liberska M, Borowski D i wsp.: Ocena układu krążenia płodu w późnym pierwszym trymestrze – doniesienie wstępne. *Ginekol Pol*, 2007; 78(11): 861–64
9. Własienko P, Hamela-Olkowska A, Jalinik K, Dangel J: Możliwość oceny płodowego układu krążenia pomiędzy 11,0 a 13,6 tygodniem ciąży w referencyjnym ośrodku kardiologii perinatalnej. *Ginekol Pol*, 2009; 80(4): 268–73. *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*
10. Rozmus-Warcholinska W, Wloch A, Acharya G i wsp.: Reference values for variables of fetal cardiocirculatory dynamics at 11–14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2010; 35(5): 540–47
11. Nicolaides KH, Azar G, Byrne D i wsp.: Fetal nuchal translucency: ultrasound screening for chromosomal defects in first trimester of pregnancy. *BMJ*, 1992; 304: 867–69
12. Hyett J, Moscoso G, Papapanagiotou G i wsp.: Abnormalities of the heart and great arteries in chromosomally normal fetuses with increased nuchal translucency thickness at 11–13 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 1996; 7: 245–50
13. Hyett JA, Perdu M, Sharland GK i wsp.: Increased nuchal translucency at 10–14 weeks of gestation as a marker for major cardiac defects. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 1997; 10: 242–46
14. Nicolaides KH: Nuchal translucency and other first-trimester sonographic markers of chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol*, 2004; 191: 45–67
15. Weiner Z, Weizman B, Beloosesky R i wsp.: Fetal cardiac scanning performed immediately following an abnormal nuchal translucency examination. *Prenat Diagn*, 2008; 28: 934–38
16. Spencer K, Souter V, Tul N i wsp.: A screening program for trisomy 21 at 10–14 weeks using fetal nuchal translucency, maternal serum free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 1999; 13: 231–37
17. Szymkiewicz-Dangel J, Hamela-Olkowska A, Własienko P i wsp.: Możliwości oceny skurczowo-rozkurczowej funkcji mięśnia sercowego u płodów między 11,0 a 13,6 tygodniem ciąży. *Ginekol Pol*, 2007; 78(3): 218–22. *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*

# Terapia genowa w chorobie wieńcowej. Badanie VIF-CAD

## Gene therapy for coronary artery disease. VIF-CAD study

Krzysztof Kukula<sup>1</sup>,  
Maciej Dąbrowski<sup>1</sup>,  
Zbigniew Chmielak<sup>1</sup>,  
Jacek Kądziera<sup>1</sup>,  
Mirosław Skwarek<sup>1</sup>,  
Mariusz Kłopotowski<sup>1</sup>,  
Lidia Chojnowska<sup>1</sup>,  
Maciej Matecki<sup>2</sup>,  
Przemysław Janik<sup>2</sup>,  
Adam Witkowski<sup>1</sup>,  
Witold Rużyłło<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instytut Kardiologii, Warszawa

<sup>2</sup> Zakład Biologii Komórki, Centrum Onkologii, Warszawa

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2003 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem prof. Witolda Rużyłło grant na realizację projektu badawczego pt. "Terapeutyczna angiogeneza w zaawansowanej chorobie wieńcowej („no-option patients”) z zastosowaniem phVEGF-A165/FGF (pVIF) podawanego metodą przezskórną. Badanie z podwójnie ślepą próbą.

### Streszczenie

Pomimo rozwoju technik rewaskularyzacji i postępu w zakresie leczenia farmakologicznego, niektórych pacjentów z chorobą wieńcową, ze względu na zaawansowanie zmian miażdżycowych, nie można skutecznie leczyć żadną ze standardowych metod. W takich przypadkach nadzieję na poprawę ukrwienia mięśnia sercowego i ustąpienie dolegliwości dławicowych wiąże się z terapią genową. W poniższej pracy omówiono metody terapeutycznej angiogenezy oraz jej dotychczasowe wykorzystanie w chorobie wieńcowej ze szczególnym uwzględnieniem badania VIF-CAD.

**Słowa kluczowe:** terapia genowa • angiogeneza • choroba wieńcowa • VEGF • bFGF • VIF-CAD

### Summary

Despite constant progress in revascularization methods and pharmacotherapy, some patients with disseminated coronary artery disease cannot be effectively treated using standard modalities. Other, novel therapies are being investigated. Of these, gene therapy holds great promise. It may enhance collateral circulation, leading to ischemic symptom resolution. This paper describes briefly current experience with gene therapy in refractory coronary disease, concentrating on the design of the VIF-CAD clinical trial.

**Key words:** gene therapy • angiogenesis • coronary artery disease • VEGF • bFGF • VIF-CAD

Wpłynęło: 24-01-2011

Zaakceptowano: 26-01-2011

Opublikowano: 30-03-2011

---

#### Adres do korespondencji:

dr med. Krzysztof Kukula,  
Instytut Kardiologii, Klinika  
Kardiologii i Angiologii  
Interwencyjnej, Samodzielna  
Pracownia Hemodynamiki,  
ul. Alpejska 42,  
04-628 Warszawa,  
e-mail: kkukula@ikard.pl,

## WSTĘP

Terapia genowa w chorobach, dla których brak obecnie leczenia przyczynowego, budzi od szeregu lat duże zainteresowanie badaczy [1–3]. Niestety, pokładane w niej nadzieje pozostają w dużej mierze niespełnione. W kardiologii główny nurt badań nad terapią genową dotyczy leczenia zaawansowanej choroby niedokrwiennej serca z zastosowaniem genów dla czynników wzrostu naczyń [4–9]. Pomimo rozwoju technik rewaskularyzacji i postępu w zakresie leczenia farmakologicznego, ze względu na zaawansowanie zmian miażdżycowych od 5 do 12% pacjentów z chorobą wieńcową, nie można skutecznie leczyć żadną ze standardowych metod [10,11]. Terapeutyczne wzmocnienie procesu angiogenezy w obrębie mięśnia sercowego mogłoby polepszyć krążenie oboczne, prowadząc do ustąpienia objawów dławicowych [1]. We wcześniejszych próbach doświadczalnych wykazano, że stymulacja tkanek czynnikami wzrostu naczyń, takimi jak VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*, naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu), FGF (ang. *fibroblast growth factor*, czynnik wzrostu fibroblastów), HGF (ang. *hepatocyte growth factor*, czynnik wzrostu hepatocytów) indukuje proces angiogenezy [2,8,9]. Aktywne formy czynników wzrostu naczyń mają krótki okres półtrwania we krwi, charakteryzują się też nasilonymi działaniami niepożądanymi przy zastosowaniu ogólnoustrojowym. Dlatego obecne badania koncentrują się na próbach wywołania angiogenezy w wyniku transfekcji komórek mięśnia sercowego genami dla czynników wzrostu naczyń.

## RODZAJE STOSOWANYCH SUBSTANCJI ANGIOGENNYCH

Ze względu na spodziewaną skuteczność, w badaniach najczęściej wykorzystuje się VEGF, a zwłaszcza jego najaktywniejszą formę zawierającą 165 aminokwasów (VEGF-A165) oraz FGF, a głównie zasadową formę FGF (bFGF, czyli FGF-2). Aby doszło do transfekcji, geny podaje się albo w postaci plazmidu (najmniejsza skuteczność transfekcji, ale prawdopodobnie największe bezpieczeństwo), w sprzężeniu z wektorem wirusowym lub w postaci liposomalnej. Prowadzone są również prace nad innymi, nowymi metodami transfekcji [3].

Generalnie można wyróżnić pięć różnych metod podania genów do mięśnia sercowego. Pierwsza z nich, najprostsza, to podanie dowieńcowe. Druga – poprzez układ żylny serca, za pomocą odwróconej perfuzji. Trzecia forma polega na bezpośrednim podaniu do mięśnia sercowego od strony nasierdza (najczęściej operacyjnie, ale również poprzez cewnik z igłą wprowadzony do układu żylnego, z wykorzystaniem nakłucia mięśnia od strony zewnętrznej

poprzez żyłę). Czwarta, to podanie bezpośrednie do mięśnia od strony wsierdza za pomocą specjalnego cewnika. Wreszcie piąta, to podanie roztworu zawierającego geny do światła lewej komory podczas operacji kardiologicznej, przy zamkniętym odpływie krwi z lewej komory [12]. Jakkolwiek pierwsze próby tego typu leczenia były zachęcające, badania kontrolowane nie wykazały jednoznacznie jego skuteczności [4–9]. Poniżej przedstawiamy krótki przegląd dotychczasowych prac.

## BADANIA EKSPERYMENTALNE

Badania kliniczne poprzedzone były licznymi eksperymentami na zwierzętach lub preparatach tkankowych [13–16]. Wykazano w nich, że stymulacja za pomocą czynników wzrostu prowadzi do rozwoju drobnych naczyń krążenia oboczno lub przypominających je struktur.

## BADANIA KLINICZNE

Kolejnym krokiem w badaniach nad terapeutyczną angiogenezą w sercu były pierwsze próby kliniczne. Większość z nich przeprowadzono bez grupy kontrolnej i bez randomizacji. Najważniejsze scharakteryzowano w Tabeli 1.

Kliniczne badania kontrolowane dotyczące terapii genowej i leczenia choroby wieńcowej czynnikami wzrostu naczyń stanowią jak dotąd nieliczną grupę. Przedstawione poniżej podsumowanie obejmuje większość z nich.

W 2001 roku Vale i wsp. opublikowali rezultaty badania, w którym wzięło udział jedynie 6 pacjentów, ale było to pierwsze badanie z zastosowaniem transendokardialnego podania plazmidu u ludzi [4].

W tym samym roku Kleiman i wsp. przedstawili wyniki pracy, w której stosowali FGF-2 podawany dowieńcowo u pacjentów z chorobą wieńcową bez możliwości rewaskularyzacji. W ciągu 6 miesięcy obserwacji nie wykazano różnicy w porównaniu do placebo [25].

W randomizowanym badaniu o akronimie FIRST, z podwójnie ślełą próbą, również podawano dowieńcowo rekombinowany FGF-2. Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy grupami. Pacjenci leczeni FGF-2 wykazywali tendencję do hipotensji [5].

W badaniu AGENT obejmującym 79 pacjentów (także randomizowanym, z podwójnie ślełą próbą) stosowano gen dla FGF-4 połączony z wektorem adenowirusowym (Ad5-FGF4), podawanym dowieńcowo [6]. W grupie badanej zaobserwowano polepszenie tolerancji wysiłku.

**Tabela 1.** Wybrane badania kliniczne bez randomizacji, w których wykazywano potencjalną skuteczność terapeutycznej angiogenezy w chorobie niedokrwiennej serca.

Badanie	Czynnik wzrostu i wektor	Sposób podania	Główne kryterium włączenia	Czas obserwacji	Wyniki
Losordo [17]	VEGF-A165, plazmid	Od zewnątrz do miokardium	Choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji	10 tygodni	Poprawa w SPECT, spadek zapotrzebowania na nitraty
Rosengart [18]	VEGF 121, wektor adenowirusowy	Od zewnątrz do miokardium	Choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji	1 miesiąc	Poprawa w SPECT, klasy CCS i tolerancji wysiłku
Laham [19]	FGF-2	Podanie dowieńcowo	Choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji	1-6 miesięcy	Poprawa tolerancji wysiłku, wzrost grubości i lokalnej kurczliwości mięśnia sercowego w MR, poprawa jakości życia
Symes [20]	VEGF-A 165, plazmid	Od zewnątrz do miokardium	Choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji, klasa CCS III i IV	3 miesiące	Poprawa w SPECT, spadek zapotrzebowania na nitraty
Hedman [21]	VEGF 121, wektor adenowirusowy	Dowieńcowo	Choroba wieńcowa, podanie w czasie angioplastyki	6 miesięcy	Zmniejszenie odsetka restenozy w stencie
Unger [22]	FGF-2	Dowieńcowo	Stabilna choroba wieńcowa	1 miesiąc	Wzrost średnicy tętnic nasierdziowych
Schumacher [23]	FGF-1	Od zewnątrz do miokardium	Trójnaczyniowa choroba wieńcowa z istotnymi zmianami w obwodowym odcinku GPZ	Od 12 tygodni do 3 lat	Nasilenie angiogenezy w okolicy dystalnej GPZ, poprawa w SPECT, zmniejszenie zapotrzebowania na nitraty
Seiler [24]	GM-CSF	Podskórnie i dowieńcowo	Choroba wieńcowa bez możliwości rewaskularyzacji	2 tygodnie	Wzrost wskaźnika przepływu wieńcowego; zmniejszenie zmian w EKG po inflacji balonu w tętnicy wieńcowej

VEGF – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu; FGF – czynnik wzrostu fibroblastów; CCS – klasa czynnościowa wg Kanadyjskiego Towarzystwa Kardiologicznego; MR – rezonans magnetyczny; GM-CSF – czynnik wzrostu linii granulocytarnej i mieloidalnej; GPZ – gałąź przednia zstępująca, SPECT – badanie izotopowe metodą tomografii emisyjnej, EKG – elektrokardiogram.

Do podobnego badania – AGENT-2 – włączono 52 pacjentów. Poprawę ukrwienia oceniano w badaniu SPECT. W zakresie globalnej perfuzji nie uzyskano istotnej statystycznie poprawy [7].

AGENT-3 i AGENT-4 to kolejne badania z wektorem adenowirusowym dołączonym do FGF-4, podawanym dowieńcowo, do których planowano włączyć po kilkuset pacjentów. Rekrutację przerwano, gdy okazało się, że nie ma szans na osiągnięcie istotnych statystycznie różnic w zakresie głównych punktów końcowych [26].

Losordo i wsp. opublikowali badanie, w którym stosowano plazmid VEGF-2 podawany transendokardialnie [27]. Wzięło w nim udział 19 pacjentów. Zaobserwowano tendencję do zmniejszenia dolegliwości dławicowych oraz wydłużenia czasu wysiłku.

Euroinject One to randomizowane badanie z podwójnie ślełą próbą, w którym zastosowano transendokardialne podanie plazmidu kodującego VEGF-A165 przy użyciu systemu NOGA [28]. Do

badania włączono 80 pacjentów. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w zakresie głównych punktów końcowych, ale wykazano regionalną poprawę kurczliwości w obszarze podania plazmidu. Ponadto, zarówno w ocenie badaniem SPECT, jak i systemem NOGA zaobserwowano regionalną poprawę perfuzji mięśnia sercowego [29].

VIVA, to randomizowane badanie z podwójnie ślełą próbą, w którym zastosowano aktywny rekombinowany VEGF u 178 pacjentów, początkowo podawany dowieńcowo, a następnie dożylnie [11]. Do 60 dnia nie zaobserwowano różnic między grupą badaną a placebo. Po 120 dniach obserwacji wystąpiła tendencja do poprawy w zakresie tolerancji wysiłku do poprawy w zakresie tolerancji wysiłku w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej.

W niedawno opublikowanym badaniu NORTHERN stosowano znacznie wyższe dawki plazmidu kodującego VEGF niż w badaniu Euroinject One [30]. Mimo to w grupie badanej w porównaniu z kontrolną nie zaobserwowano poprawy ani w zakresie perfuzji ocenianej w badaniu izotopowym, ani

w zakresie objawów klinicznych. Badanie to pokazało jednak, że zastosowanie wysokich dawek plazmidu kodującego VEGF jest bezpieczne. Rodzi to nowe możliwości eksperymentalne, gdyż jednym z podstawowych problemów terapii genowej jest skuteczność transfekcji komórek „*in vivo*”.

Z powyższych danych wynika, że nie ma jak dotąd jasnej odpowiedzi na pytanie, czy terapia genowa choroby wieńcowej może być skuteczna przy użyciu obecnie stosowanych metod. Z tego względu w Instytucie Kardiologii w Warszawie zaplanowano i przeprowadzono badanie VIF-CAD, którego protokół i założenia przedstawiono poniżej.

## BADANIE VIF-CAD

Badanie VIF-CAD było współfinansowane przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji RP oraz Fundację na Rzecz Wspierania Rozwoju Polskiej Farmacji i Medycyny (obecnie Naukowa Fundacja Polpharmy). Zastosowano w nim plazmid dwucistronowy kodujący naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) oraz czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) [31]. Głównym punktem końcowym była ocena perfuzji mięśnia sercowego w badaniu izotopowym metodą tomografii emisyjnej pojedynczego fotonu (SPECT). Poza monitorowaniem leczenia, metoda ta umożliwia również zlokalizowanie docelowego obszaru mięśnia sercowego dla podania plazmidu. Dla weryfikacji wyników SPECT oraz dla poszerzenia diagnostyki o ocenę segmentalnej kurczliwości lewej komory (która powinna ulec zwiększeniu w następstwie poprawy ukrwienia) zaproponowano równoległą ocenę wymienionych parametrów metodą rezonansu magnetycznego (MR).

W badaniu zastosowano metodę bezpośredniego podania plazmidu do mięśnia sercowego. Wydaje się ona najskuteczniejszym sposobem podania genów dla czynników wzrostu, gdyż straty podanego preparatu są wtedy najmniejsze.

Jak wcześniej wspomniano, stosowane są trzy metody transfekcji komórek: podawanie „nagiego” plazmidu zawierającego odpowiedni fragment kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNA), kompleksu liposomalnego zawierającego plazmid lub użycie wektora wirusowego. Pierwsze dwie metody są stosunkowo proste technicznie, ale mało skuteczne – przy ich użyciu do komórek dociera poniżej 1% podanego DNA. Jednak DNA wprowadzone w ten sposób do komórek nie integruje się z genomem, co podnosi bezpieczeństwo transfekcji i sprawia, że wprowadzony gen dla czynnika wzrostu podlega ekspresji jedynie przez pewien ograniczony czas, z reguły 4–6 tygodni. Bardziej efektywne jest

użycie wektora wirusowego. W przypadku komórek nie proliferujących, takich jak kardiomiocyty, w grę wchodzi głównie użycie wektora adenowirusowego lub AAV (ang. adeno-associated virus). Wektor adenowirusowy może jednak powodować efekt cytopatyczny, reakcję zapalną i wywoływać odpowiedź immunologiczną. Z tego względu w badaniu VIF-CAD zdecydowano o zastosowaniu plazmidu.

## Pacjenci

Do badania włączono 52 pacjentów, z których 33 przydzielono losowo do grupy leczonej, a 19 otrzymało plazmid placebo (grupa kontrolna). W chwili rekrutacji wszyscy chorzy pozostawali w III lub IV klasie CCS (bólę dławicowe przy małym wysiłku lub w spoczynku), otrzymywali optymalne leczenie farmakologiczne zgodne z zaleceniami Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego i nie kwalifikowali się do rewaskularyzacji metodami standardowymi. Frakcja wyrzucania lewej komory u każdego chorego wynosiła powyżej 35%, a w badaniu SPECT z dipirydamolem wykazano istotne odwracalne zaburzenia perfuzji. Charakter zmian w naczyniach wieńcowych chorych kwalifikowanych do badania wykluczał możliwość dalszej rewaskularyzacji za pomocą angioplastyki lub pomostowania naczyń wieńcowych (zapis badania angiograficznego chorych był każdorazowo oceniany przez kardiologa interwencyjnego i kardiochirurga). Z badania wykluczano chorych ze złą funkcją skurczową lewej komory (EF <35% stwierdzoną w echokardiografii lub wentrykulografii), po świeżo przeżytym zawałe mięśnia sercowego (<3 tygodnie), pacjentów z chorobą nowotworową, autoimmunologiczną lub ciężką chorobą ogólną, pacjentki w wieku rozrodczym, jak również chorych nie wyrażających zgody na udział w badaniu.

## Metodyka

Głównym punktem końcowym badania były zmiany w ukrwieniu mięśnia sercowego, oceniane w badaniach SPECT i MR, wykonanych po 5 miesiącach od zabiegu, w porównaniu do wyników badań wyjściowych. Niestety, na skutek niedostatecznej ilości i jakości danych nie można było w sposób wiarygodny ocenić punktu końcowego związanego z oceną MR. Oceniono porównawczo jedynie badania SPECT.

Drugorzędowymi punktami końcowymi badania były: a) zmiana wydolności wieńcowej oceniana w teście wysiłkowym EKG, b) zmiana ukrwienia miokardium lub powstanie nowych kolaterali widocznych w badaniu angiograficznym, c) poprawa kliniczna w zakresie tolerancji wysiłku i jakości życia, d) wystąpienie poważnych sercowych objawów niepożądanych (MACE), tj. zgonu, zawału serca

oraz hospitalizacji z powodów kardiologicznych – ocena wyników obserwacji odległej, e) zmiana stężenia FGF i VEGF w surowicy, f) monitorowanie ewentualnych działań niepożądanych, związanych z podaniem plazmidu, g) monitorowanie zdarzeń mogących mieć związek z nadmiernym działaniem VEGF lub FGF w miejscu i poza miejscem podania.

#### Badanie perfuzji mięśnia sercowego Tc-99m-MIBI SPECT

Badanie techniką SPECT wykonywano w spoczynku (po podaniu nitrogliceryny) i w wysiłku (po podaniu i.v. dipirydamolu), stosując protokół 2-dniowy (0,3 mCi/kg w spoczynku i 0,3 mCi/kg w wysiłku) lub 1-dniowy (0,11 mCi/kg w spoczynku i 0,3 mCi/kg w wysiłku). Warunki akwizycji badań SPECT: matryca 64×64, kąt rotacji gammakamery – 180 stopni, liczba projekcji – 68, kolimator – niskoenergetyczny wysokorozdzielczy. Czas akwizycji jednej projekcji w protokole 2-dniowym wynosi 25 sek, w protokole 1-dniowym – 52 sek. w spoczynku i 13 sek., w wysiłku. Warunki rekonstrukcji badań SPECT: filtr przed-rekonstrukcyjny Butterwortha o częstotliwości odcięcia równej 0,4 częstotliwości Nyquista i o rzędzie równym 7. Stosowano MIBI produkcji OBRI-POLATOM (Świerk, Polska).

#### Klonowanie bicistronowego wektora pVIF

Konstrukt pVIF jest plazmidowym wektorem ekspresyjnym kodującym czynniki o charakterze angiogennym. Wklonowana kasetka jest dwucistronowa. Zawiera ona: gen kodujący VEGF165 (pubmed X62568), sekwencję IRES (na podstawie matrycy wklonowanej do wektora pIRES-EGFP, clontech, cat. #6064-1) oraz sekwencję kodującą bFGF (pubmed E02544). Sekwencja IRES pochodzi z wirusa encephalomyocarditis (ECMV) i zapewnia translację dwóch wklonowanych genów na bazie jednej bicistronowej sekwencji mRNA. W kasecie sekwencje VEGF, jak i FGF poprzedzane są przez sekwencje sygnałowe umożliwiające sekrecję powstałych białek VEGF i FGF. Schemat kasetki ekspresyjnej w wektorze pVIF:

5' - 3'

CMV	ATG	Igk	VEGF	TGA	IRES	ATG	Igk	bFGF	TGA
-----	-----	-----	------	-----	------	-----	-----	------	-----

CMV – promotor, ATG – trójka startowa, TGA – trójka terminalna, Igk – sekwencja sygnałowa, VEGF – naczyniowo śródbłonkowy czynnik wzrostu, bFGF – zasadowy fibroblastyczny czynnik wzrostu, IRES – sekwencja wiązania do rybosomów.

Klonowanie przeprowadzono na lepkie końce, zgodnie z ramką odczytu od trójki ATG, wykorzystano

odczynniki firmy Amersham, wektor amplifikowano w bakteriach *E.coli* szczepu DH5 $\alpha$ , izolację przeprowadzono zestawem EndoFree Plasmid Mega Kit firmy Qiagen. Ważniejsze cele klonowania wektora pVIF:

- wektor zaindukuje w warunkach *in vivo* powstanie bardziej dojrzałych i ustabilizowanych naczyń krwionośnych w porównaniu z wektorem kodującym tylko VEGF, tym samym terapia genowa (próby na pacjentach) przyniesie bardziej efektywną i szybszą poprawę stanu klinicznego pacjenta,
- iniekcja wektora dwucistronowego wiąże się bezpośrednio z wprowadzeniem mniejszej dawki endotoksyn niż w sytuacji podania dwóch jednogennych wektorów, niweluje się tym samym niebezpieczeństwo poważnych powikłań (wstrząs, stany gorączkowe),
- iniekcja wektora dwucistronowego to również mniejsza dawka samego DNA, choć raczej nie spotyka się doniesień o toksyczności samego DNA,
- koszt uzyskania jednego wektora dwucistronowego – izolacja, oczyszczanie, badanie poziomu ednotoksyn jest mniejszy niż dwóch wektorów jednogennych.

Do klonowania wektora pVIF wykorzystano dwa wektory posiłkowe: pSEC/VEGF oraz pusty wektor pSEC. Wektor pSEC/VEGF sklonowano wcześniej, jest to ekspresyjny wektor plazmidowy kodujący izoformę VEGF165. Zawiera on sekwencję sygnałową umożliwiającą wyrzut białka VEGF poza komórkę. Tok postępowania był następujący:

- subklonowanie sekwencji IRES z wektora pMIG/IRES do wektora pSEC/VEGF,
- wklonowanie sekwencji bFGF do wektora pSEC,
- subklonowanie kasetki ATG – Igk – bFGF z wektora pSEC/bFGF do wektora pSEC/VEGF/IRES.

Sekwencję IRES amplifikowano reakcją PCR na matrycy sekwencji wklonowanej do wektora pMIG. Startery do PCR zaprojektowano tak, aby wносиły miejsca rozpoznawalne przez restryktazy EcoRI i NotI:

RBS-1: 5'- AAGAATTCCAATTCCGCCCTCTCCCT -3'

RBS-2: 5'- AAGCGGCCGCTTGTGGCAAGCTTATCATC -3'

Produkt PCR oczyszczano zestawem clean-up (DNA-Gdańsk), trawiono EcoRI i NotI przez 1 h w temp. 37°C i izolowano z żelu agarozowego zestawem QIAquick Gel Extraction Kit firmy Qiagen. Wektor pSEC/VEGF również trawiono EcoRI i NotI, rozdzielano elektroforetycznie i izolowano z żelu. Ligowano przez 16 h w 16°C wykorzystując aktywność ligazy T4 (Amersham). Liganty transformowano do bakterii *E. coli*, przeprowadzono selekcję klonów na płytkach agarowych z ampicyliną. Wyrosłe klony przepasażowano do płynnej pożywki LB z ampicyliną. Hodowano przez noc w 37°C.

Z klonów izolowano plazmidy, które poddano następnie analizie restrykcyjnej. Otrzymano w ten sposób wektor pSEC/VEGF/IRES.

Sekwencję kodującą bFGF amplifikowano na bazie cDNA z komórek linii HUVEC (ang. human umbilical vein endothelial cell). Startery zaprojektowano z miejscami restrykcyjnymi dla EcoRI i XhoI:  
HbF-1: 5'- ATGAATTCGCCAGCATTGCCCGAGGAT -3'  
HbF-2: 5'- TTCTCGAATTCAGCTCTTAGCAGACAT -3'

Produkt PCR oczyszczano zestawem clean-up (DNA-Gdańsk), trawiono EcoRI i XhoI przez 1 h w temp. 37°C i izolowano z żelu agarozowego zestawem QIAquick Gel Extraction Kit firmy Qiagen. Wektor pSEC również trawiono EcoRI i XhoI, rozdzielano elektroforetycznie i izolowano z żelu. Ligowano przez 16 h w 16°C wykorzystując aktywność ligazy T4 (Amersham). Liganty transformowano do bakterii *E. coli*, przeprowadzono selekcję klonów na płytkach agarowych z ampicyliną. Wyrosłe klony przepasażowano do płynnej pożywki LB z ampicyliną. Hodowano przez noc w 37°C. Z klonów izolowano plazmidy, które poddano następnie analizie restrykcyjnej. Otrzymano w ten sposób wektor pSEC/FGF.

Z wektora pSEC/FGF przeklonowano kasetę ATG – Igκ – FGF do wektora pSEC/VEGF/IRES. Fragment ten amplifikowano reakcją PCR. Zaprojektowano nowy starter – wprowadzający miejsce dla NotI oraz wykorzystano starter HbF-2. Sekwencja startera sens:  
Not\_Igκ: 5'- AAGCGGCCGCACCATGGAGACAGACACA -3'

Dalej postępowano podobnie jak wcześniej: produkt PCR oczyszczano zestawem clean-up (DNA-Gdańsk), trawiono NotI i XhoI przez 1 h w temp. 37°C i izolowano z żelu agarozowego zestawem QIAquick Gel Extraction Kit firmy Qiagen. Wektor pSEC/VEGF/IRES również trawiono enzymami NotI i XhoI, rozdzielano elektroforetycznie i izolowano z żelu. Ligowano przez 16 h w 16°C wykorzystując aktywność ligazy T4 (Amersham). Liganty transformowano do bakterii *E. coli*, przeprowadzono selekcję klonów na płytkach agarowych z ampicyliną. Wyrosłe klony przepasażowano do płynnej pożywki LB z ampicyliną. Hodowano przez noc w 37°C. Z klonów izolowano plazmidy, które poddano następnie analizie restrykcyjnej. Otrzymano w ten sposób wektor pSEC/VEGF/IRES/FGF (pVIF).

#### Piśmiennictwo:

1. Buschmann I, Schaper W: The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol*, 2000; 190: 338–42
2. Freedman SB, Isner JM: Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med.*, 2002; 136: 54–71

Powstały konstrukt został poddany szczegółowej analizie restrykcyjnej – stosowano różne kombinacje restryktaz; przeprowadzono również kilka reakcji PCR w oparciu o różne zestawy starterów, jak również sekwencjonowano konstrukt. Wszystkie analizy potwierdziły prawidłowe klonowanie – otrzymano wektor z bicistronową kasetą ekspresyjną VEGF/IRES/FGF:

5' - -3'

CMV	ATG	Igκ	VEGF	TGA	IRES	ATG	Igκ	bFGF	TGA
-----	-----	-----	------	-----	------	-----	-----	------	-----

#### Procedura podania plazmidu pVIF

Pacjentów biorących udział w badaniu, spełniających kryteria włączenia i nie spełniających kryteriów wyłączenia standardowo przygotowywano do zabiegu cewnikowania serca. Przy użyciu systemu NOGA wykonywano mapowanie lewej komory w celu określenia jej geometrii oraz obszaru, do którego powinien być wstrzyknięty plazmid [32]. Mapa zawierała średnio  $77 \pm 20$  punktów. Następnie cewnik mapujący wymieniano na cewnik infuzyjny MYO-STAR z dodatkowym kanałem zakończonym cienką wysuwaną igłą. Plazmid podawano do wyznaczonego wcześniej obszaru w całkowitej dawce 0,5 mg w 1 ml, w 5 porcjach o objętości 0,2 ml. Jednorazowo przez cewnik infuzyjny podawano 0,2 ml roztworu plazmidu. Proces pojedynczego wstrzyknięcia plazmidu do niedokrwionego mięśnia sercowego trwał od 20 do 40 sekund. Ufiksowanie igły w miokardium monitorowano pod kontrolą fluoroskopii oraz na podstawie rejestracji pobudzeń dodatkowych komorowych.

#### PODSUMOWANIE

Badanie VIF-CAD zostało zakończone, a jego dokładne wyniki oraz ich analiza zostaną ogłoszone drukiem [32]. W ogólnym podsumowaniu wyników badania należy stwierdzić, że:

- terapia genowa za pomocą plazmidu dwucistronowego VEGF/FGF nie przyniosła poprawy w zakresie głównego punktu końcowego, czyli perfuzji mięśnia sercowego ocenianej metodą SPECT,
- osiągnięto istotną statystycznie poprawę w zakresie dwóch drugorzędowych punktów końcowych: tolerancji wysiłku ocenianej za pomocą próby wysiłkowej EKG oraz objawów klinicznych choroby wieńcowej ocenianej za pomocą skali Kanadyjskiego Towarzystwa Kardiologicznego (CCS),
- nie stwierdzono działań niepożądanych związanych z podaniem plazmidu w ciągu rocznego okresu obserwacji.



3. Rissanen TT, Yla-Herttuala S: Current status of cardiovascular gene therapy. *Mol Ther*, 2007; 15: 1233–47
4. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE i wsp.: Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*, 2001; 103: 2138–43
5. Simons M, Annex BH, Laham RJ i wsp.: Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomised, controlled clinical trial (FIRST). *Circulation*, 2002; 105: 788–93
6. Grines CL, Watkins MW, Helmer G i wsp.: Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation*, 2002; 105: 1291–97
7. Grines CL, Watkins MW, Mahmarian JJ i wsp.: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of Ad 5 FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol*, 2003; 42: 1339–47
8. Morishita R, Aoki M, Hashiya N i wsp.: Therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor (HGF). *Curr Gene Ther*, 2004; 4: 199–206
9. Ware JA, Simons M: Angiogenesis in ischemic heart disease. *Nature Med.*, 1997; 3: 158–64
10. Epstein SE, Fusch S, Zhou Y i wsp.: Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards. *J Cardiovasc Res*, 2001; 49: 532–42
11. Henry TD, Annex BH, McKendall GR i wsp.: The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation*, 2003; 107: 1359–65
12. Melo LG, Pachori AS, Kong D i wsp.: Gene and cell-based therapies for heart disease. *FASEB J*, 2004; 18: 648–63
13. Satake S, Kuzuya M, Ramos MA i wsp.: Angiogenic stimuli are essential for survival of vascular endothelial cells in three-dimensional collagen lattice. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 244: 642–46
14. Mooradian DL, Diglio CA: Effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta 1 on rat heart endothelial cell anchorage-dependent and independent growth. *Exp Cell Res*, 1990; 186: 122–29
15. Goto F, Goto K, Weindel K i wsp.: Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest*, 1993; 69: 508–17
16. Yue X, Tomanek RJ: Effects of VEGF(165) and VEGF(121) on vasculogenesis and angiogenesis in cultured embryonic quail hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001; 280: H2240–47
17. Losordo DW, Vale PR, Symes JF i wsp.: Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*, 1998; 98: 2800–4
18. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR i wsp.: Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation*, 1999; 100: 468–74
19. Laham RJ, Chronos NA, Pike M i wsp.: Intracoronary basic fibroblast growth factor (FGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase I open-label dose escalation study. *J Am Coll Cardiol*, 2000; 36: 2132–39
20. Symes JF, Losordo DW, Vale PR i wsp.: Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thorac Surg*, 1999; 68: 830–36
21. Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M i wsp.: Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio Angiogenesis Trial (KAT). *Circulation*, 2003; 107: 2677–83
22. Unger EF, Goncalves L, Epstein SE i wsp.: Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris. *Am J Cardiol*, 2000; 85: 1414–19
23. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU i wsp.: Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation*, 1998; 97: 645–50
24. Seiler C, Pohl T, Wustmann K i wsp.: Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*, 2001; 104: 2012–17
25. Kleiman NS, Califf RM: Results from late-breaking clinical trials sessions at ACCIS 2000 and ACC 2000. *J Am Coll Cardiol*, 2000; 36: 310–25
26. Grines CL: The AGENT clinical trials programme. *Eur Heart J*, 2004; 6(Suppl.E): E18–23
27. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC i wsp.: Phase I/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*, 2002; 105: 2012–18
28. Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A i wsp.: Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris. A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol*, 2005; 45: 982–88
29. Gyongyosi M, Khorsand A, Zamini S i wsp.: NOGA-guided analysis of regional myocardial perfusion abnormalities treated with intramyocardial injections of plasmid encoding vascular endothelial growth factor A-165 in patients with chronic myocardial ischemia: subanalysis of the EUROINJECT-ONE multicenter double-blind randomized study. *Circulation*, 2005; 112(9 Suppl.): I157–65
30. Stewart DJ, Kutryk MJ, Fitchett D i wsp.: VEGF gene therapy fails to improve perfusion of ischemic myocardium in patients with advanced coronary disease: results of the NORTHERN trial. *Mol Ther*, 2009; 17: 1109–15
31. Małecki M, Swoboda P, Jastrzębski Z i wsp.: *In vivo* study of angiogenic plasmid preparations-the bicistronic plasmid as a new type of drug for vascular diseases. *Acta Pol Pharm*, 2004; 61: 289–95
32. Kukuła K, Chojnowska L, Dabrowski M i wsp.: Intramyocardial plasmid-encoding human vascular endothelial growth factor A165/basic fibroblast growth factor therapy using percutaneous transcatheter approach in patients with refractory coronary artery disease (VIF-CAD). *Am Heart J*, (w druku). *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*

# Badania przedkliniczne i próby kliniczne z zastosowaniem czynników pro-angiogennych w chorobach naczyniowo-sercowych – genetycznie modyfikowane mioblasty

Preclinical studies and clinical trials in cardio-vascular diseases with the use of genetically modified myoblasts with pro-angiogenic factors

Maciej Kurpisz

Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Naukowa Fundacja Polpharmy w 2004 roku przyznała zespołowi pracującemu pod kierunkiem prof. Macieja Kurpisha grant na realizację projektu badawczego pt. *Możliwości leczenia pozawałowej niewydolności krążenia przy pomocy autologicznych komórek macierzystych i/lub genetycznie modyfikowanych – próby przedkliniczne.*

## Streszczenie

W trakcie minionej dekady trwały intensywne badania zmierzające do ograniczenia cywilizacyjnych chorób układu naczyniowo-sercowego i ich śmiertelnego oddziaływania na populację społeczeństw rozwiniętych. Próby te obejmowały terapię genową, zaindukowanie terapeutycznej angiogenezy, wprowadzenie terapii komórkowych z użyciem komórek macierzystych. Większość z nich wykazała fiasko zauważalnej poprawy klinicznej w próbach randomizowanych z włączeniem placebo lub też nikły efekt poprawy przejściowej (komórki macierzyste). Pobudziło to niezwykłą aktywność na całym świecie, w aspekcie opracowania terapii genowej z nowymi wektorami, wieloma transgenami stosowanymi jednocześnie, połączenia modyfikacji genetycznych z użyciem komórek macierzystych. Omawiany postęp prac możliwy był dzięki Naukowej Fundacji Polpharmy, w obrębie przedstawionego projektu III/11/2004, w którym zastosowano wszystkie najnowocześniejsze podejścia badawcze w celu wypracowania modelu przedklinicznej oceny efektywności funkcjonalnej reprogramowanych genetycznie komórek macierzystych.

**Słowa kluczowe:** angiogeneza • komórki macierzyste • mioblasty • serce pozawałowe

## Summary

In the past decade, the intensive work has been devoted to limit the mortality of the developed societies due to the cardiovascular diseases. These attempts included gene therapy, induction of therapeutic angiogenesis, implementation of cellular therapies with application of stem cells. Most of the studies failed to document statistically significant clinical improvement in double-blind randomized trials (with placebo) or little transient effect of undertaken approaches (with stem cell therapies). This stimulated unusual activity world-wide in order to improve this cost-effective attempts including new vectors for transgene transfer, multiple gene application, combination of genetic modifications with stem cell application. This progress in Poland was also due to the initiative of Polpharma Scientific Foundation in which sponsored project III/11/2004 we were able to apply all the above mentioned most modern technologies in order to make a foundation for preclinical, functional model enabling us to assess *in situ* advantages of genetic stem cell re-programming for clinical purposes.

**Key words:** angiogenesis • stem cells • myoblasts • post infarction heart

Wpłynęło: 08-01-2011  
Zaakceptowano: 10-01-2011  
Opublikowano: 30-03-2011

---

**Adres do korespondencji:**  
prof. dr hab. Maciej Kurpisz,  
Instytut Genetyki Człowieka  
PAN, ul. Strzeszyńska 32,  
60-479 Poznań,  
e-mail:  
kurpimac@man.poznan.pl

## WSTĘP

Angiogeneza to proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych w życiu dorosłego osobnika. Należy ją odróżnić od innego procesu tworzenia naczyń *de novo*, waskulogenezy, która przebiega jedynie w okresie płodowym (organogenezy). Dodatkowo proces angiogenezy należy odróżnić od arteriogenezy, która polega na remodelingu (a nie na tworzeniu nowych) małych naczyń w wyniku działania różnorodnych czynników, m.in. fizycznych (np. 'shear stress', czyli siła ścinania). Zatem angiogeneza jest skomplikowanym, wieloetapowym procesem, podczas którego musi zajść wiele przemian. Wyróżnia się zwykle jej 5 podstawowych etapów [1]. Czynnikiem pobudzającym angiogenezę są zwykle niedotlenienie lub niedokrwienie czy też stan zapalny, które działają na cytokiny oraz podstawowe czynniki pro-angiogenne, typu VEGF czy FGF. Wstępnym sygnałem jest zwiotczenie istniejących naczyń przez tlenek azotu. W dalszej konsekwencji dochodzi do uruchomienia enzymów proteolitycznych, które uruchamiają 'surowiec' dla wytworzenia nowych struktur naczyniowych poprzez degradację błony podstawnej już istniejących naczyń oraz macierzy pozakomórkowej. Następnie integryny ułatwiają i regulują adhezję i migrację komórek śródbłonna, zaś pobudzenie komórek śródbłonna (zwłaszcza ich mobilność i proliferację) powodują cząsteczki uwalniane z samej macierzy, tj. np. czynniki wzrostu fibroblastów, zwane potocznie FGF. Proliferacja komórek śródbłonna warunkuje wytworzenie nowych rurkowatych struktur, które następnie dojrzewają i stabilizują się pod wpływem angiopoetyn i odpowiednich dla nich receptorów. Jednak liczba czynników biorących udział w tym procesie jest w przedstawionym zarysie daleko niekompletna. Najbardziej prominentne czynniki pro-angiogenne zamieszczono w Tabeli 1 [2].

Należy podkreślić, że angiogeneza w życiu dorosłego osobnika ma miejsce także w procesach fizjologicznych, np. w krezce jelita czy też przy wytwarzaniu łożyska. Ponadto neowaskularyzacja jest częścią obrazu patologicznego przewlekłych zmian zapalnych towarzyszących astmie, reumatycznemu zapaleniu stawów, łuszczycy, chorobom układu pokarmowego, jak np. choroba Crohna czy wrzodziejące zapalenie jelita grubego; może być przyczyną ślepoty w wyniku przewlekłych zmian zachodzących w siatkówce czy rogówce (retinopatia cukrzycowa, zwyrodnienie plamki), odgrywa rolę w powstawaniu otyłości (rozwój tkanki tłuszczowej) czy endometriozy, towarzyszy wytwarzaniu pęcherzyków płucnych, zwykle we wczesnym etapie postnatalnym. Oczywiście niedotlenienie jest silnym bodźcem angiogenezy w układzie sercowo-naczyniowym, występującym w chorobie niedokrwiennej serca, miażdżycy naczyń

Tabela 1. Czynniki pobudzające i hamujące angiogenezę.

Stymulatory	Inhibitory
VEGF	Angiostatyna
angiopoetyna-1	anty-angiogenna anty-trombina III
β-estradiol	kanstatyna
FGF	endostatyna (fragment kolagenu XIII)
interleukina-8	heparynowy fragment
leptyna	fibronektyny
MCP-1	interferony-α, -β, -γ
MMPs	interleukina 4
NOS	interleukina 12
PDGF-BB	interleukina 18
TNF-α	inhibitor aktywatora plazminogenu
angiogenina	PEDF
TGF	16 kDa fragment prolaktyny
	TSP-1
	Retinoidy

Zmodyfikowane wg Pandya i wsp. [2].

Skróty: VEGF – (*vascular endothelial growth factor*) naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna; FGF – (*fibroblast growth factor*) fibroblastowy czynnik wzrostu; MCP-1 – (*macrophage chemoattractant protein*) makrofagowe białko chemoatrakcyjne; MMPs – (*matrix metalloproteases*) metaloproteinazy macierzy; NOS – (*nitric oxide synthase*) syntaza tlenu azotu; PDGF-BB – (*platelet derived growth factor-BB*) czynnik BB płytkopochodnego czynnika wzrostu; TGF – (*transforming growth factor*) transformujący czynnik wzrostu; TNF-α – (*tumor necrosis factor α*) czynnik martwiczy nowotworowy; PEDF – (*pigment epithelium derived growth factor*) pigmentowy, nabłonkopochodny czynnik wzrostu; TSP-1 – (*thrombospondin-1*) trombospondyna-1.

krwionośnych, udarze, niedokrwieniu kończyn dolnych (obwodowe upośledzenie unaczynienia).

Oprócz zebranych w Tabeli 1 czynników regulujących angiogenezę należy zauważyć rolę licznych elementów komórkowych, zwłaszcza makrofagów, komórek dendrytycznych czy re-cyrkulujących komórek pochodzenia mielomonocytnego [3]. Oprócz tzw. pomocniczych komórek pro-angiogennych, najbardziej prominentną rolę w neowaskularyzacji spełniają macierzyste progenitorowe komórki śródbłonna. Precyzyjne określenie ich biomarkerów oraz podstawowe definicje komórkowe z tego zakresu podano w Tabeli 2 [4].

## METODYKA

## Strategie terapii genowej w chorobach naczyniowo-sercowych, zastosowanie czynnika pro-angiogenego, VEGF

Jedną z najbardziej ekstensywnie wykonywanych prób terapii genowej była poprawa angiogenezy w chorobach naczyniowo-sercowych, zwłaszcza w chorobach niedokrwienych kończyn (naczyń obwodowych) oraz naczyń wieńcowych i unaczynień kolateralnych w obrębie miokardium. Pierwszym

**Tabela 2.** Obowiązująca terminologia ludzkich śródbłonkowych komórek progenitorowych.

Terminologia właściwa	Biomarkery identyfikujące	Terminologia występująca w dotychczasowej literaturze	Referencje
Proangiogenne komórki hemopoetyczne	CD34 <sup>+</sup> , CD31 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup> (VEGFR2 <sup>+</sup> ), CD202b <sup>+</sup> (Tie2 <sup>+</sup> ) CD62E <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> UEA-1 <sup>+</sup> , AcLDL uptake, CD14 <sup>-</sup>	EPC	[5,6,7,8]
	CD133 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup>	CEP	[9]
	CD31 <sup>+</sup> CD309 <sup>+</sup> CD202b <sup>+</sup> , formują kolonie mieloidalne <i>in vitro</i> rozróżnialne od późno proliferujących komórek śródbłonka (ECFCs) poprzez brak ekspresji BMP2 i BMP4 CD45 <sup>dim</sup> CD133 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD144 <sup>+</sup> , CD309 <sup>+</sup> CD34 <sup>bright</sup> CD31 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> CD45 <sup>dim</sup> CD14 <sup>-</sup> CD41a <sup>-</sup> CD235a <sup>-</sup>	EPC/CFU	[10,11]
Cyrkulujące komórki śródbłonka	CD146 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup> DAPI <sup>+</sup> CD105 <sup>+</sup> żywotne, nieproliferujące komórki śródbłonkowe	EPC komórki proangiogenne CEC	[12,13,14] [15,16,17,18,19]
Śródbłonkowe komórki tworzące kolonie	CD34 <sup>bright</sup> CD31 <sup>+</sup> CD133 <sup>-</sup> CD45 <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup> CD41a <sup>-</sup> CD235a <sup>-</sup> żywotne, proliferujące komórki, tworzące duże 14-dniowe kolonie, śródbłonkowe przekraczające klaster 50-cio komórkowy. Wykazują także ekspresję CD105 i CD146	ECFC	[14,20,21,22,23,24,25]

Modyfikacja wg Watt i wsp. [4].

Skróty: UEA-1 – (*Ulex europaeus agglutinin 1*) Kolcolist zachodni, aglutynina o powinowactwie skierowanym do flukozy; AcLDL – (*acetylated low density lipoprotein*) acetylowane lipoproteiny o małej gęstości; BMP-2, 4 – (*bone morphogenetic protein 2, 4*) morfogenetyczne białko kości; EPC – (*endothelial progenitor cells*) progenitorowe komórki śródbłonka; CEP – (*circulating endothelial presursors*) krążące progenitorowe komórki śródbłonkowe; EPC/CFU (*endothelial progenitor cells/colony forming unit*); śródbłonkowe komórki progenitorowe formujące kolonie; CEC – (*circulating endothelial cells*) krążące prekursorowe komórki śródbłonka; ECFC – (*endothelial colony forming cells*) komórki śródbłonka formujące kolonie.

z zastosowanych czynników był sklonowany w roku 1989 naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonka VEGF-A, popularnie znany jako VEGF [26]. Obecnie w rodzinie VEGF rozróżnia się 6 izoform (VEGF A-F), przy czym przynależy do niej także czynnik łożyskowy, znany pod nazwą PlGF. Ligandami tego czynnika są trzy receptory, opisywane w literaturze jako VEGFR-1-3, które są sygnałowymi strukturami kinaz tyrozynowych. Najbardziej potentnym czynnikiem pro-angiogennym wydaje się być izoforma VEGF-A, stąd jej najszersze stosowanie w ponad 15-letniej literaturze w badaniach o charakterze przedklinicznym (na zwierzętach doświadczalnych), jak i w próbach klinicznych. Rola zarówno PlGF jak i VEGF-B pozostaje trudna do zdefiniowania, są one stosunkowo słabymi mitogenami dla komórek śródbłonka, nie są silnymi induktorami przepuszczalności naczyń (w odróżnieniu do VEGF-A) i dopiero długa ekspozycja *in vivo* na PlGF lub VEGF-B promuje angiogenezę włączając w to nie do końca wyjaśnioną ich rolę pośrednią w stymulowaniu czynnika VEGF-A. Czynniki VEGF C i D formują podrodzi-  
nę czynników VEGF, odpowiedzialną za właściwości limfoangiogenne, natomiast VEGF E i F, będące homologami wirusowymi i/lub jadu żmiji są stosunkowo najmniej scharakteryzowane, jednak również wykazują silne właściwości pro-angiogenne. W badaniach przedklinicznych z zastosowaniem tylko jednego czynnika pro-angiogenego (VEGF) wykazano, że

efekty jego wprowadzenia (bądź jako genu lub produktu białkowego) są silnie zależne od stężenia lokalnego; stosunkowo niskie stężenia odpowiedzialne są za homeostazę naczyń krwionośnych, przetrwanie komórek śródbłonka, produkcję NO i prostacyklin, co objawia się działaniem naczynio-rozszerzającym, antykrzepliwym i supresorowym wobec proliferacji mięśniówki gładkiej (naczynia), zaś stosunkowo wysokie jego stężenia są odpowiedzialne wobec efektu angio- i waskulogenego. Wnioski wynikające z ponad dekady trwających prób przedklinicznych, są między innymi takie, że nadekspresja sekwencji genowych izoform VEGF A, C i D wywoływała działanie prewencyjne wobec restenoz objawiających się po zaindukowanym urazie naczyniowym (mysz, szczur, królik), jednak nie zaobserwowano pozytywnego efektu na samą (uformowaną już) restenozę, co sugerowało, że najlepszym celem dla terapii genowej z użyciem VEGF wydają się być stany niedokrwienne zarówno w mięśniu sercowym jak i na obwodzie (np. kończyny dolne). W badaniach z użyciem zwierząt doświadczalnych odrzucono też pierwotne hipotezy, że przejściowa a nawet długotrwała nadekspresja VEGF może powodować progresję miażdżycy naczyń (zarówno u myszy jak i człowieka), jakkolwiek nie można tego wykluczyć przy długo utrzymujących się wysokich stężeniach VEGF, zwłaszcza zaś w toku przemiany blaszki miażdżycowej. Na rok 2007 (projekt naukowy Naukowej Fundacji

**Tabela 3.** Bieżące problemy prób klinicznych w zakresie terapeutycznej angiogenezy z zastosowaniem czynnika VEGF.

Problem	Przyczyna	Potencjalne rozwiązanie
Brak wyraźnej klinicznej poprawy w randomizowanych próbach klinicznych z użyciem placebo stosując nadekspresję genu lub rekombinowane białko VEGF w grupie pacjentów 'no-option'	Szybki półokres rozpadu rekombinowanego białka VEGF Niska efektywność transferu genowego Zbyt niska dawka (ekspresja) sekwencji genowej Trudna populacja pacjentów	Optymalizacja wektora i sposobu podania. Interwencja z użyciem większych objętości dawki transgeny i wielokrotnych podań. Użycie VEGF jako czynnika dodatkowego w terapii skojarzonej z innymi procedurami.
Brak przekonującego udokumentowania zwiększonej perfuzji tkankowej (2–6 mies. po interwencji) w klinicznych próbach z użyciem VEGF, pomimo przekonujących dowodów uzyskiwanych w próbach przedklinicznych z użyciem zwierząt doświadczalnych	Zbyt niska efektywność transferu genowego Regresja niedojrzałych naczyń w przedziale 2 tygodni po procedurze przejściowej transfekcji genu	Pomiar perfuzji w 5-6 dni po podaniu wektora z sekwencją dla udowodnienia koncepcji o zwiększonej obecności produktu genowego. Użycie innych wektorów o lepszej efektywności zapewniającej nadekspresję transgeny.
Obrzęk tkankowy związany z próbą efektywnej angiogenezy o znaczeniu klinicznym	Czynnik VEGF sam w sobie powoduje zwiększoną przepuszczalność naczyń Zwiększona perfuzja, ciśnienie kapilarne i proliferacja komórek w ścianie naczyń powoduje przeciek białek	Dalsza optymalizacja wektorów z włączeniem możliwości regulacji ekspresji transgeny. Wprowadzenie kombinacji kilku czynników pro-angiogennych. Wprowadzenie opcji długotrwałej nadekspresji genu.

Polpharmy wykonywano w latach 2005–2008) zanotowano około 10 prób klinicznych z użyciem VEGF (próby kliniczne fazy II/III) dla wywołania terapeutycznej angiogenezy w chorobie wieńcowej czy też naczyń obwodowych naczyń tętnicznych, PAD – peripheral artery disease. W przeciwieństwie do badań nierandomizowanych, w których zaobserwowano silny efekt placebo, w znakomitej większości badań randomizowanych w obu jednostkach chorobowych nie zanotowano statystycznie istotnych różnic w poprawie klinicznego stanu pacjentów w grupie poddanej terapii wobec grupy kontrolnej [27]. Jedynym efektem prób terapii z zastosowaniem VEGF, wydaje się być zatem na dzień dzisiejszy brak wyraźnych efektów ubocznych (poza miejscowym, przejściowym obrzękiem w miejscu podania VEGF). Nie ma wystarczająco udokumentowanych raportów w aspekcie indukcji powstawania guza nowotworowego, neowaskularyzacji w innych narządach nie poddanych terapii (teoria przecieku) czy też naczyniowych deformacji i/lub zwiększonej miażdżycy czy niestabilności blaszki miażdżycowej. Najważniejsze kontrowersje dotyczące prób klinicznych z wywołaniem terapeutycznej angiogenezy z użyciem VEGF zebrano w Tabeli 3.

#### Strategie z użyciem komórek macierzystych dla regeneracji mięśnia sercowego w modelu pozawałowym, ze szczególnym uwzględnieniem komórek pochodzenia miogenego

Dotychczas ukazało się kilka zaledwie meta-analiz dotyczących kilkudziesięciu jak dotąd przeprowadzonych

prób klinicznych w mięśniu sercowym z najbardziej popularnymi populacjami komórek macierzystych, tj. głównie z komórkami o potencjale progenitorowym (ukierunkowanym) lub co najwyżej multipotencjalnym (komórki mezenchymalne), a także unipotencjalnym (mioblasty, macierzyste komórki pochodzenia miogenego) [28]. Z grubsza przyczyny kliniczne wprowadzania komórek macierzystych (najczęściej pochodzących ze szpiku kostnego oraz miogennych) można podzielić na: a) przeprowadzane w zawałach ostrych, b) w przewlekłym niedokrwieniu miokardium, c) w zastoinowej niewydolności serca. W podsumowaniu należy stwierdzić, że w stanach kardiomiopatii niedokrwiennej (obejmuje zarówno interwencje z mieszaninami jednojądrzastych komórek szpiku, mezenchymalnymi komórkami szpikowymi czy też separowanymi komórkami CD 133) obserwuje się przejściową poprawę parametrów hemodynamicznych serca (ocenianych wobec frakcji wyrzutowej serca, czy też objętości końcowo-systolicznej lub końcowo diastolicznej), przy czym poprawa występuje po ok. 3–6 mies. od momentu podania komórek i zanika w około 18 miesięcy od momentu podania. Obserwowano także poprawienie regionalnej i całkowitej perfuzji mięśnia sercowego, co zwłaszcza przyjęto za wskaźnik pro-angiogenne działanie (na drodze auto- i/lub parakrynowej) niektórych subpopulacji komórek szpikowych (zarówno z linii hematopoetycznych jak i pro-środbłonkowych wg biomarkerów wskazanych w Tabeli 2). Średnie uzyskane z tych interwencji wynoszą ok. 3–5% w odniesieniu do poprawy frakcji wyrzutowej (EF), a więc nie różnią się dramatycznie od efektywności stosowania np. popularnych beta blokerów. W aspekcie podawania komórek pochodzenia

miogennego (mioblasty) wykazano po ponad 20 próbach klinicznych [29], brak istotności statystycznej we wszczepianiu tych komórek przy okazji pomostowania aortalno-wieńcowego, natomiast w większości stosowanych podań przezskórnych (jakkolwiek nie randomizowanych) wykazano niekiedy spektakularne poprawy frakcji wyrzutowej serca (EF >10%). Mioblasty nie są z reguły wszczepiane w zawałach ostrych, a jedynie odległych, a poprawa frakcji wyrzutowej serca również występuje dopiero po ok. 3 mies. od podania komórek i nie trwa zwykle dłużej niż 2 lata. O ile komórki pochodzenia szpikowego mają potencjalnie niezwykle zdolność wymigrowywania z miokardium (najczęściej podaje się je kateterami do naczynia wieńcowego zapopatrującego region zawału), o tyle mioblasty muszą być podawane intramiokardialnie (system NOGA), co skutkuje to zamiennie większym potencjałem do retencji w obrębie miokardium. Pośrednie wnioski sugerują zatem zanik poprawy indukowanej macierzystymi komórkami szpikowymi poprzez zanik efektu auto/parakrynowego, zaś w przypadku mioblastów ich małą zdolnością przeżycia w warunkach patogennych (okolice blizny pozawałowej), niskim potencjałem parakrynowym oraz bardzo ograniczonym (jeśli w ogóle) potencjałem pro-angiogennym. Można, zatem wnosić o zaniku przeżywalności mioblastów w trakcie ich przebywania na terenie miokardium, co wiąże się ze stopniowym zanikiem poprawy w obserwowanych parametrach klinicznych. W tym aspekcie, ze względu na brak dowodów u człowieka dla procesu transdiferencjacji komórek macierzystych (zarówno szpikowych jak i pochodzenia miogennego) powstała idea wprowadzania modyfikacji genetycznych stosowanych komórek macierzystych (co zrealizowano w obrębie proponowanego grantu Naukowej Fundacji Polpharmy), zwłaszcza w aspekcie poprawienia potencjału pro-angiogennego mioblastów ludzkich i przez to zwiększenia możliwości ich adaptacji w narządzie docelowym.

**PROJEKT NAUKOWEJ FUNDACJI POLPHARMY  
– „MOŻLIWOŚCI LECZENIA POZAWAŁOWEJ  
NIEWYDOLNOŚCI KRAŻENIA PRZY POMOCY  
KOMÓREK MACIERZYSTYCH GENETYCZNIE  
MODYFIKOWANYCH – PRÓBY PRZEDKLINICZNE”**

Projekt zawarł w sobie wszystkie najnowocześniejsze trendy zmierzające do aplikacji procedur medycznych z użyciem leku biologicznego (komórki macierzyste) i obejmował lata 2005–2008. W początkach realizacji projektu było oczywiste, że ani terapia genowa z użyciem jednego tylko z czynników pro-angiogenezy, ani wektory dotychczas zastosowane, ani terapia z użyciem natywnych komórek macierzystych (w tym mioblastów) nie jest w stanie odpowiedzieć na wyzwanie środowiska patogennego narządu. Nie podlegające transdiferencjacji ludzkie komórki macierzyste, pomimo szerokiego wachlarza

kandydatów ze strony komórek multipotencjalnych lub ukierunkowanych progenitorów wyraźnie nie zachowywały stabilności ekspresji wyjściowego profilu genetycznego, co ujawniono przy pomocy techniki mikromacierzy. Fakt ten musiał zakładać podjęcie w najbliższej przyszłości modyfikacji genetycznych komórek. W obliczu narządów słabo ukrwionych (rejon serca pozawałowego) nie budziło najmniejszych wątpliwości, że implantowane komórki macierzyste winny być obdarzone wysoką ekspresją czynników pro-angiogennych (i/lub cytoprotekcyjnych) dla zapobieżenia ich szybkiego ubytku na drodze intensywnej apoptozy towarzyszącej pierwszej fazie implantacji i/lub potencjału do namnażania się w warunkach *in situ*, w narządzie biorczym. W tym okresie zaczęły ukazywać się pierwsze prace z użyciem wektorów bicistronowych, uwzględniających pod jednym promotorem ekspresji, co najmniej dwóch czynników pro-angiogennych, które dostarczały nie tylko impulsu do tworzenia naczyń (jak VEGF), ale także ich późniejszej stabilizacji. W wektorach tych używano sekwencji VEGF i angiopoetyny-1 lub VEGF i bFGF. Wydawało się bezspornym, przy porównaniu działania obu tych czynników rozdzielnie, że działają one oba w warunkach chronicznego niedotlenienia narządu, jednak ich synergistyczny wspólny efekt przekraczał wpływ każdego z nich oddzielnie [30]. Dlatego też w przedstawionym do Fundacji projekcie założono: a) modyfikację genetyczną dotąd używanych ‘natywnych’ komórek macierzystych (mioblastów), b) wprowadzenie wektora bicistronowego, zawierającego sekwencje VEGF i FGF-4 o prawdopodobnym efekcie synergistycznym na angiogenezę [31], c) jednocześnie potraktowano mioblasty jako potencjalne wektory wprowadzające czynniki pro-angiogenne do narządu docelowego (serca pozawałowego). Aby badanie to posłużyło do formuły badań przedklinicznych, zastosowano dwa układy komórkowe – a) ustalonych linii mioblastów mysich genetycznie modyfikowanych, b) pilotowe wprowadzenie genetycznie modyfikowanych mioblastów do serca po zawale (indukowanym doświadczalnie) w zwierzętach immunokompromisowanych. Jednocześnie przygotowano cały cykl modelowy (dla prób przedklinicznych) od operacji mikrochirurgicznych na myszach SCID począwszy na interwencjach komórkowych i próbach ich oceny w echokardiografii serca myszy, rezonansie magnetycznym oraz planimetrii, skończywszy.

**OCENA WYNIKÓW BADANIA W PROJEKCIE  
NAUKOWEJ FUNDACJI POLPHARMY III/1 I/2004**

W omawianym projekcie Naukowej Fundacji Polpharmy wykonano szereg działań znacznie przekraczających zarówno merytorycznie jak i finansowo oryginalne zadania badawcze, postulowane

w powyżej wymienionym Projekcie [32]. Przed wszystkim zoptymalizowano warunki dla dokonywania transfekcji, wektorem bicistronowym (konstrukcja pTRUF użyczona dla celów projektu przez prof. J. Dulaka i A. Józkowicz z Instytutu Biotechnologii UJ w Krakowie). Pozostałe geny (NOS3 i cytoprotekcyjne) wklonowano do plazmidu pCi-Neo (Promega), zapewniającego ekspresję w komórkach eukariotycznych. Wykorzystano plazmid zawierający białko GFP (pEGFP-C1) dla optymalizacji warunków transfekcji. Konstrukcje wprowadzono do mioblastów mysich (a następnie zawieszono w komórkach ludzkich, w eksperymentach pilotujących) z zastosowaniem lipofekcji. Wydajność oceniano przy użyciu cytometru przepływowego, oceniając odsetek komórek wykazujących obecność białka GFP. Testowano czynniki (FugeneHD-Roche, PrimeFect-LONZA, Nanofectamina-PAA, Turbofect-Fermentas) wykazując zróżnicowaną efektywność transfekcji od 0–35%. W zależności od stosunku DNA/odczynnik Fugene, uzyskano w transfekcji przejściowej (mierzona po 48 godzinach) odsetek ok. 60% pozytywnych komórek (dotyczyło to również wektora bicistronowego). Stosując testy oceniające intensywność proliferacji komórkowej przy pomocy inkorporacji BrdU w populacjach komórek po transfekcji stwierdzono zwiększoną jej efektywność wobec komórek nietransfekowanych, jednak bez uzyskania znamienności statystycznej. Za to w teście oceniającym szybkość proliferacji (S+G2. S+G0/G1+G2) mioblastów mysich przy pomocy fluorymetru przepływowego (test NIM-DAPI) stwierdzono znamienne wyższe tempo proliferacji zarówno w przypadku komórek transfekowanych przejściowo jak i stabilnie, w stosunku do komórek z populacji kontrolnych (zwłaszcza w przypadku komórek transfekowanych plazmidem bicistronowym pTRUF-22-FGF-ires-VEGF). Wykonano ocenę wpływu transfekcji na funkcjonalny test pro-angiogeny (z użyciem proliferacji komórek HUVEC oraz ‘pączkowania’ kapilar). W wyniku testu proliferacji komórek HUVEC zaobserwowano wzrost proliferacji komórek śródbłonna, wskutek oddziaływania medium kondycjonowanego z komórek transfekowanych wobec standardowego medium dla mioblastów mysich, jednak nie ponad poziom obserwowany dla optymalnego medium używanego dla proliferacji komórek HUVEC. Wydaje się, zatem, że wydzielane czynniki stymulujące proliferację komórek HUVEC osiągnęły stan wysycenia wobec parametrów ocenianych w tym właśnie teście dla obu typów porównywanych mediów. Natomiast kondycjonowane medium (uzyskane po transfekcji przejściowej czynnikami pro-angiogennymi w sposób znamienny zwiększało produkcję kapilar w agregatach komórek HUVEC w porównaniu ze wszystkimi innymi populacjami komórek (także

transfekowanymi białkiem eGFP). Podobnej znamienności statystycznej nie uzyskano w przypadku mioblastów mysich transfekowanych stabilnie. Sprawdzano ekspresję genów procesu miogenezy (zwłaszcza uczestniczących w niej czynników transkrypcyjnych) i stwierdzono, że zarówno przejściowa jak stabilna transfekcja mioblastów mysich nie oddziaływały na ekspresję genów wczesnej fazy miogenezy (Myf5, MyoD, Mef2), natomiast transfekcja przejściowa czynnikami pro-angiogennymi obniżała ekspresję niektórych genów późnych stadiów miogenezy (np. gen Myf6). W przypadku obserwowanych zjawisk apoptozy/nekrozy mioblastów mysich stwierdzono podwyższone poziomy apoptozy (jednak nie statystycznie znamienne) po transfekcji przejściowej i brak różnic w poziomach nekrozy porównywanych populacji mioblastów (transfekowane vs nietransfekowane). W odniesieniu do transfekcji stabilnych nie zidentyfikowano w ogóle apoptozy w populacjach transfekowanych czynnikami pro-angiogennymi komórek, natomiast w sytuacji zaindukowanego stresu oksydacyjnego wobec mioblastów, w żadnym z badanych wariantów nie zaobserwowano różnic statystycznie znamiennych w poziomie apoptozy/nekrozy, jakkolwiek poziomy apoptozy/nekrozy w warunkach standardowych różniły się statystycznie znamienne wobec tych w warunkach stresu zaindukowanego (przy braku istotnych różnic w żywotności ocenianych komórek, w każdym z badanych wariantów).

W projekcie Naukowej Fundacji Polpharmy wypracowano model dla oceny przedklinicznej modyfikowanych genetycznie mioblastów. W tym celu wystandaryzowano warunki zaindukowania zawału serca w myszach szczepów immunokompromisowanych (SCID oraz NOD/SCID), umożliwiając tolerogenność tych zwierząt wobec wszelkich innych wszczepianych mioblastów, zarówno pochodzenia od innych gryzoni (mysz, szczur), jak i człowieka. Zawał indukowano poprzez podwiązanie tętnicy wieńcowej wstępującej. Operacje odbywały się w warunkach myszy zaintubowanej (z użyciem specjalistycznych respiratorów mysich) i znieczulenia wziewnego (system parowniczek ze znieczulającym środkiem wziewnym z domieszką tlenu). Następnie prowadzono interwencje z komórkami (genetycznie modyfikowanymi lub nie) – jednocześnie z wywołaniem zawału ostrego, jak i w przypadkach zawału późnego (po miesiącu od zaindukowanego zawału). Model zawału późnego był szczególnie starannie testowany dla modyfikacji mioblastów pośrednimi czynnikami pro-angiogennymi (eNOS) i genami cytoprotekcyjnymi, natomiast model zawału świeżego wykorzystywany był głównie dla czynników pro-angiogennych VEGF/FGF-4. Poprawę lub jej brak w parametrach hemodynamicznych/

funkcjonalnych serca oceniano przy pomocy a) echokardiografu mysiego z sondą 100 MHz, b) rezonansu magnetycznego we współpracy z Instytutem Fizyki Jądrowej PAN w Krakowie oraz c) planimetrii z celowanym barwieniem na proces włóknienia miokardium w okolicy pozawałowej. Udokumentowano różnice istotne statystycznie, zwłaszcza po interwencjach komórkowych mioblastami mysimi do okolicy pozawałowej (w zawałe późnym) modyfikowanymi genami NOS3 oraz sekwencjami cytoprotekcyjnymi, objawiającymi się poprzez zwiększenie frakcji wyrzutowej serca (echokardiograf, rezonans magnetyczny) w porównaniu z komórkami niemodyfikowanymi genetycznie lub w porównaniu do operacji typu 'sham'. Obecność komórek wprowadzanych do okolicy pozawałowej dokumentowana była poprzez znakowanie implantowanych komórek tlenkami żelaza (preparat Endorem), ujawnianych w następstwie odczynu histochemicznego na skrawkach histologicznych. W tych przypadkach obserwowano też obniżony poziom włóknienia w mięśniu sercowym (planimetria). Reasumując, w omawianym projekcie dokonano zarówno dokumentacji *in vitro* jak i oceny funkcjonalnej *in situ* korzystnego wpływu genetycznych modyfikacji mioblastów na regenerację pozawałowego mięśnia sercowego u myszy, opracowując układ modelowy dla przeprowadzania badań przedklinicznych z użyciem mioblastów ludzkich oraz dalszych modyfikacji genetycznych z późniejszym celem klinicznym.

#### KONTYNUACJA BADAŃ

Badania przeprowadzone w obrębie projektu Naukowej Fundacji Polpharmy III/11/2004 stały się podwaliną dla bardzo silnego nurtu badawczego, obecnie rozwijanego w obrębie Zakładu Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych Instytutu Genetyki Człowieka PAN w dwóch głównych aspektach, a) stanowią kanwę dla badań nad modyfikacjami genetycznymi mioblastów ludzkich (komórkowych zawiesin pierwotnych), zarówno w aspekcie badań *in vitro* jak i testów funkcjonalnych *in situ*, b) zaprowadzony model testów funkcjonalnych na pozawałowym mięśniu sercowym myszy stał się

podstawą obecnie prowadzonej oceny przedklinicznej. Można śmiało powiedzieć, że ZBRiKM stał się jednym z nielicznych w Polsce ośrodków tego typu, który szeroko współpracuje w zakresie badań terapii genowej z włączeniem komórek macierzystych. Obecnie współpraca ta jest kontynuowana zarówno w kierunku chorób degeneracyjnych ośrodkowego układu nerwowego (z Instytutem Chemii Bioorganicznej PAN) oraz z macierzystymi komórkami nowotworowymi (z Uniwersytetem Medycznym w Poznaniu), w aspekcie zarówno badań przedklinicznych oraz późniejszych prób klinicznych. Obecnie wypracowany model serca pozawałowego będzie służył do oceny efektywności reprogramowania komórek ludzkich, do uzyskania ich ograniczonej multipotentności (plastyczności), a co najważniejsze kontynuowane są intensywnie modyfikacje genetyczne mioblastów dla polepszenia kontaktu elektrofizjologicznego pomiędzy wszczepianymi komórkami macierzystymi a kardiomocytami narządu biernego. Uzyskano zadowalającą ekspresję i tworzenie połączeń szczelinowych w mioblastach modyfikowanych genetycznie, przez co zdecydowano się na pierwsze w świecie próby kliniczne z użyciem genetycznie modyfikowanych mioblastów ludzkich (genem koneksyny 43) we współpracy z Instytutem Kardiologii w Warszawie oraz Kliniką Kardiologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Próby te rozpoczną się w roku 2011. Jednocześnie, zakładając wymianę wektorów w przypadku podejmowanych prób z użyciem czynników pro-angiogennych, kontynuowane są badania dla polepszenia warunków macierzystych komórek implantowanych do pozawałowego miokardium w aspekcie polepszenia perfuzji okolicy pozawałowej, a tym samym stopnia przeżycia i funkcji implantowanych komórek. Projekt Polpharmy, realizowany w latach 2005–2008 stał się niezwykle istotnym dla całego cyklu prac i projektów badawczych, a zwłaszcza obecnie realizowanego Projektu Rozwojowego, będącego w prostej linii kontynuacją wcześniej podjętych badań w zakresie immunobiologii komórek macierzystych pochodzenia miogennego i ich praktycznego stosowania we współczesnej medycynie.

#### Piśmiennictwo:

1. Zielonka TM: Angiogeneza – Część I. Mechanizm powstania nowych naczyń krwionośnych. *Alerg Astma Immun*, 2003; 8: 169–74
2. Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD: Angiogenesis – a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol*, 2006; 44(5): 265–74
3. David Dong ZM, Aplin AC, Nicosia RF: Regulation of angiogenesis by macrophages, dendritic cells, and circulating myelomonocytic cells. *Curr Pharm Des*, 2009; 15: 365–79
4. Watt SM, Athanassopoulos A, Harris AL i wsp.: Human endothelial stem/progenitor cells, angiogenic factors and vascular repair. *J R Soc Interface*, 2010; 7(Suppl.6): S731–51



5. Asahara T, Murohara T, Sullivan A i wsp.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997; 275: 964–67
6. Shi Q, Rafii S, Wu MH i wsp.: Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*, 1998; 92(2): 362–67
7. Kalka C, Masuda H, Takahashi T i wsp.: Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000; 97: 3422–27
8. Takahashi T, Kalka C, Masuda H i wsp.: Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Nat Med.*, 1999; 5: 434–38
9. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D i wsp.: Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000; 95: 952–58
10. Hill JM, Zalos G, Halcox JP i wsp.: Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.*, 2003; 348: 593–600
11. Smadja DM, Bièche I, Silvestre JS i wsp.: Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neo-angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008; 28: 2137–43
12. Fox A, Smythe J, Fisher N i wsp.: Mobilization of endothelial progenitor cells into the circulation in burned patients. *Br J Surg*, 2008b; 95: 244–51
13. Smythe J, Fox A, Fisher N i wsp.: Measuring angiogenic cytokines, circulating endothelial cells, and endothelial progenitor cells in peripheral blood and cord blood: VEGF and CXCL12 correlate with the number of circulating endothelial progenitor cells in peripheral blood. *Tissue Eng Part C Methods*, 2008; 14: 59–67
14. Estes ML, Mund JA, Ingram DA i wsp.: Case J. Identification of endothelial cells and progenitor cell subsets in human peripheral blood. *Curr Protoc Cytom*, 2010; 52: 9.33.1–11
15. Mancuso P, Bertolini F: Circulating endothelial cells as biomarkers in clinical oncology. *Microvasc Res*, 2010; 79: 224–28
16. Erdbruegger U, Dhaygude A, Haubitz M i wsp.: Circulating endothelial cells: markers and mediators of vascular damage. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2010; 5: 294–302
17. Rowand JL, Martin G, Doyle GV i wsp.: Endothelial cells in peripheral blood of healthy subjects and patients with metastatic carcinomas. *Cytometry A*, 2007; 71: 105–13
18. Srijbos MH, Gratama JW, Kraan J i wsp.: Circulating endothelial cells in oncology: pitfalls and promises. *Br J Cancer*, 2008; 98: 1731–35
19. Srijbos MH, Verhoef C, Gratama JW i wsp.: On the origin of (CD105+) circulating endothelial cells. *Thromb Haemost*, 2009; 102: 347–51
20. Case J, Mead LE, Bessler WK i wsp.: Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*, 2007; 35: 1109–18
21. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H i wsp.: Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*, 2004; 104: 2752–60
22. Melero-Martin JM, Bischoff J: Chapter 13. An *in vivo* experimental model for postnatal vasculogenesis. *Methods Enzymol*, 2008; 445: 303–29
23. Reinisch A, Hofmann NA, Obenauf AC i wsp.: Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 2009; 113: 6716–25
24. Timmermans F, Van Hauwermeiren F, De Smedt M i wsp.: Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007; 27: 1572–79
25. Zhang Y, Fisher N, Newey SE i wsp.: The impact of proliferative potential of umbilical cord-derived endothelial progenitor cells and hypoxia on vascular tubule formation *in vitro*. *Stem Cells Dev*, 2009; 18: 359–75
26. Ylä-Herttua S, Rissanen TT, Vajanto I i wsp.: Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*, 2007; 49: 1015–26
27. Cao Y: Therapeutic angiogenesis for ischemic disorders: what is missing for clinical benefits? *Discov Med.*, 2010; 9: 179–84
28. Kurpisz M: Próby przedkliniczne i kliniczne zastosowania komórek macierzystych do regeneracji mięśnia sercowego. *Postępy Biol Komórki*, 2010; 37: 209–23
29. Seidel M, Borczynska A, Rozwadowska N, Kurpisz M: Cell-based therapy for heart failure: skeletal myoblasts. *Cell Transplant*, 2009; 18(7): 695–707. *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*
30. Hughes GC, Biswas SS, Yin B i wsp.: Therapeutic angiogenesis in chronically ischemic porcine myocardium: comparative effects of bFGF and VEGF. *Ann Thorac Surg*, 2004; 77: 812–18
31. Malecki M, Kolsut P, Proczka R: Angiogenic and antiangiogenic gene therapy. *Gene Ther*, 2005; 12: S159–69
32. Bialas M, Krupka M, Janeczek A i wsp.: Transient and stable transfections of mouse myoblasts with genes coding for pro-angiogenic factors. *J Physiol Pharmacol*, 2010 [Epub ahead of print]. *Publikacja powstała w wyniku realizacji grantu Naukowej Fundacji Polpharmy*