



www.fpn.info.pl

Cena 24,50 zł

Farmaceutyczny

PISMO POD PATRONATEM WYDZIAŁU FARMACEUTYCZNEGO ŚLĄSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W KATOWICACH

IC Value - Current 3.66
MNIŚW 4

Miesięcznik

Przegląd Naukowy

ROK VI (X)
Nr 3/2009 (50)

Scientific Review in Pharmacy

ILOŚCIOWA OCENA mRNA TGF β 1
I JEGO RECEPTORÓW W KWALIFIKACJI CHORYCH
Z PRZEWLEKŁYM ZAPALENIEM WĄTROBY TYPU B
DO LECZENIA INTERFERONEM α

MOLEKULARNE PODSTAWY
AKTYWNOŚCI FARMAKOLOGICZNEJ
I TOKSYCZNOŚCI PARACETAMOLU

ROZDZIAŁ BIAŁEK ŻÓŁTKA JAJA KURZEGO

SELEN – PIERWIASTEK NIEZBĘDNY
DLA ZDROWIA CZŁOWIEKA

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES
OF NEW PYRIMIDINE DERIVATIVES
AND 1, 2, 3, 4-TETRAHYDROPYRIMIDO[4,5-D]
PYRIMIDINES

WSPÓŁCZESNE PROBLEMY FLEBOLOGII
– PRZEWLEKŁA CHOROBA ŻYLNIA

ZMIANY W AKTYWNOŚCI KINAZY KOMPLEKSU
DEHYDROGENAZYPIROGRONIANOWEJ (PDH)
W WĄTROBACH SZCZURÓW, POD WPŁYWEM
WYSOKIEJ I NISKIEJ DAWKI KWASU KAWOWEGO. CZ. I.

WYDAWNICTWO
Kwieciński
ISSN 1425-5073

20
Lat



Farmaceutyczny

PISMO POD PATRONATEM WYDZIAŁU FARMACEUTYCZNEGO ŚLĄSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W KATOWICACH

Przegląd Naukowy

Index Copernicus 9,66
MNSW 4

Scientific Review in Pharmacy

Redaktor Naczelny:

Prof. dr hab. Krystyna Olczyk

Adres redakcji:

41-200 Sosnowiec, ul. Jedności 8

Tel. 500 722 219

Fax. 032/364-11-34

Mail: fpn@kwiecinski.pl

Konsultacyjna Rada Naukowa

Przewodniczący:

Prof. dr hab. Krystyna Olczyk - Sosnowiec

Członkowie:

Prof. dr hab. Edward Bańkowski - Białystok

Prof. dr hab. Jerzy Brandys - Kraków

Prof. dr hab. Elżbieta Brzezińska - Łódź

Prof. dr hab. Kazimierz Głowniak - Lublin

Prof. dr hab. Edmund Grześkowiak - Poznań

Prof. dr hab. Ewa Jagiełło-Wójtowicz - Lublin

Prof. dr hab. Krzysztof Jonderko - Sosnowiec

Prof. dr hab. Marcin Kamiński - Katowice

Prof. dr hab. Jan Pachecka - Warszawa

Prof. dr hab. Jerzy Pałka - Białystok

Prof. dr hab. Janusz Pluta - Wrocław

Prof. dr hab. Janusz Solski - Lublin

Prof. dr hab. Marek Wesołowski - Gdańsk

Prof. dr med. Kinga Howorka - AKH, UW, Wiedeń, Austria

Dr hab. Janusz Wegrowski - Reims, Francja

Sekretarz Naukowy:

Dr n. med. Robert D. Wojtyczka

Członkowie Kolegium Redakcyjnego:

Dr n. farm. Paweł Olczyk

Dr n. biol. Małgorzata Kępa

Mgr Anna Szeremeta

Mgr Agnieszka Jura – Półtorak

Wydawca:

Grupa dr. A. R. Kwecińskiego



WYDAWNICTWO
Kweciński



Adres Wydawcy:

Grupa dr. A. R. Kwecińskiego

ul. Wiśniowa 25/2, 43-300 Bielsko-Biała

tel. (0-33) 817-28-79 fax (0-33)817-36-31

Prezes: dr n. med. Adam Kweciński

Marketing Manager:

Agnieszka Romańska

agnieszka.romanska@kwiecinski.pl

Opracowanie graficzne:

Robert Cyganik

Skład:

Jerzy Partyka

Nakład: do 7 000 egz.

Wszystkie materiały opublikowane w piśmie objęte są ochroną Prawa autorskiego. Projekty chronione są Ustawą o Prawie autorskim i pokrewnych prawach z 1994 r. (Dz. U. Nr 24, poz. 83). Redakcja zastrzega sobie prawo dostosowania nadesłanych materiałów do potrzeb pisma. Przedruki możliwe jedynie za zgodą wydawcy. Za treść materiałów reklamowych oraz listów od czytelników redakcja nie odpowiada.

Spis treści

ILOŚCIOWA OCENA mRNA TGFβ1 I JEGO RECEPTORÓW W KWALIFIKACJI CHORYCH Z PRZEWLEKŁYM ZAPALENIEM WĄTROBY TYPU B DO LECZENIA INTERFERONEM α	13
MOLEKULARNE PODSTAWY AKTYWNOŚCI FARMAKOLOGICZNEJ I TOKSYCZNOŚCI PARACETAMOLU	19
ROZDZIAŁ BIAŁEK ŻÓŁTKA JAJA KURZEGO	25
SELEN – PIERWIASTEK NIEZBĘDNY DLA ZDROWIA CZŁOWIEKA	29
SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF NEW PYRIMIDINE DERIVATIVES AND 1, 2, 3, 4-TETRAHYDROPYRIMIDO[4,5-D] PYRIMIDINES	34
WSPÓŁCZESNE PROBLEMY FLEBOLOGII – PRZEWLEKŁA CHOROBA ŻYŁNA	41
ZMIANY W AKTYWNOŚCI KINAZY KOMPLEKSU DEHYDROGENAZYPIROGRONIANOWEJ (PDH) W WĄTROBACH SZCZURÓW, POD WPŁYWEM WYSOKIEJ I NISKIEJ DAWKI KWASU KAWOWEGO. CZ. I.	46



Szanowni Państwo,
Koleżanki i Koledzy,
Drodzy Czytelnicy

Witam w kolejnym zeszycie *Farmaceutycznego Przeglądu Naukowego*. W bieżącym numerze, obok szerokiego jak zawsze wachlarza prac z zakresu różnych specjalności nauk farmaceutycznych i innych dziedzin nauk biomedycznych, prac reprezentujących zaprzyjaźnione (czyli wszystkie w Polsce) ośrodki naukowe, zamieszczamy zapowiedź o kolejnym, międzynarodowym, znaczącym wydarzeniu o charakterze naukowym i edukacyjnym. Przedsięwzięciem tym jest coroczna Konferencja Europejskiego Stowarzyszenia Wydziałów Farmaceutycznych (*EAFP – European Association of Faculties of Pharmacy*), która w bieżącym roku odbędzie się w Oslo, w dniach 18. – 20. czerwca.

Na zamieszczenie komunikatu o wspomnianej wyżej Konferencji w naszym czasopiśmie uzyskałam zgodę Pani Profesor Karen Marie Ulshagen, Przewodniczącej Komitetu Organizacyjnego i Członka Komitetu Naukowego Konferencji, a jednocześnie Członka Komitetu Wykonawczego *EAFP* i zarazem Dziekana Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu w Oslo. Pani Profesor wyraziła zadowolenie, iż *Farmaceutyczny Przegląd Naukowy* rozpropaguje ideę bieżącej Konferencji, stając się jednocześnie doskonałą platformą przekazania polskim farmaceutom informacji o tym znaczącym w świecie europejskiej farmacji wydarzeniu.

Warto wspomnieć, iż nasze Wydziały Farmaceutyczne – choć nie wszystkie, należą do *EAFP*. Corocznie, od wielu lat, Polska reprezentowana jest na kolejnych konferencjach tego Stowarzyszenia. Uczestnictwo to przekłada się na promowanie naszych Uczelni na forum europejskim, pozwala poznać osiągnięcia zagranicznych Wydziałów Farmaceutycznych, umożliwiając także wdrażanie nowoczesnych procedur w zakresie edukacji i zapewniania jakości kształ-

cenia, nie tylko w zakresie szkolenia przeddyplomowego. Tegoroczna bowiem Konferencja pod nazwą *New issues in postgraduate / post-registration pharmacy education*, poświęcona jest właśnie szeroko rozumianemu szkoleniu poddyplomowemu, obejmującemu jak wiadomo nie tylko szkolenia ciągłe, lecz także i specjalizacyjne czy też – i studia III stopnia, czyli studia doktoranckie.

Zapraszam serdecznie do lektury naszego bieżącego numeru *Farmaceutycznego Przeglądu Naukowego*.

W zeszycie tym, wzorem poprzedniego, znajdzie się kolejna praca anglojęzyczna. Wraz z urozmaicaniem oferty przedkładanych w naszym czasopiśmie artykułów, zabiegamy o uczestnictwo w Konsultacyjnej Radzie Naukowej Profesorów z zagranicy, co w efekcie zbliżyć będzie *FPN* do czasopisma o międzynarodowym charakterze.

Szanowni Państwo, Drodzy Autorzy. Z niesłabnącą energią zapraszam do nadsyłania prac do *FPN*, bowiem dzięki nim nie tylko budujemy przyszłość naszego wspólnego czasopisma, ale dajemy szansę całemu środowisku poznania tak cennych Państwa osiągnięć i dokonań.

Szanowni Państwo, Drodzy Czytelnicy. Gorąco zapraszam do lektury bieżącego i następnych numerów czasopisma, bowiem pozwoli to Państwu na pogłębienie swojej wiedzy, stając się także inspiracją do zaprezentowania własnych dokonań na łamach tak przyjaznej i dla wszystkich otwartej platformy jaką jest nasz *FPN*.

Życząc wielu słonecznych dni, rozświetlonych dodatkowo naukowymi – i wszelkimi innymi sukcesami, pozostaję z wyrazami ogromnej sympatii,

Redaktor Naczelny
Prof. dr hab. n. med. Krystyna Olczyk



EUROPEAN ASSOCIATION
OF FACULTIES OF PHARMACY



UNIVERSITY
OF OSLO

European Association of Faculties of Pharmacy 2009 Annual Conference:

New Issues in Postgraduate / post-registration Pharmacy Education

Oslo

June 18 - 20, 2009



http://www.farmasi.uio.no/EAFP_Oslo2009

Welcome to the yearly meeting of the European Association of Faculties of Pharmacy in Oslo, 18th to 20th June, 2009

The School of Pharmacy at the University of Oslo and the European Association of Faculties of Pharmacy (EAFP) are delighted to invite you to the annual EAFP conference on pharmaceutical education in Oslo, Norway from 18th to 20th June, 2009.

Earlier congresses have mainly focused on different aspects of the master degree in pharmacy (Bologna first and second cycle). The development of the pharmaceutical field however calls for further education and specialization beyond the master level. In Europe there are as many ways to pursue this challenge as there are national states. In the Bologna framework the Ph.D. degree is the only formal framework for postgraduate education (third cycle). The educational needs for pharmacists to be able to practice as specialists in various fields do not always fit into the Ph.D.-programs. We have a need for a more diversified tool-box. Currently this includes continuing professional education (CPD), internships, master on master degrees, industrial Ph.D.s and many other options. Some fit into the Bologna system and some do not. During the congress we will look closer into the different challenges we face regarding education after the Bologna second cycle level, and we will present how European countries meet the challenges.

Faculty members, pharmacy students and members of pharmaceutical institutions are welcome to participate in the conference. You are all invited to present posters on pharmaceutical postgraduate/post registration education and CPD, and some posters will be invited for oral presentation during the symposium.

Oslo is the capital of Norway. It is situated between the Oslo fjord and the green hills surrounding the city. The congress will take place during midsummer time when there is daylight all night. Do not miss this unique opportunity to discuss and develop pharmaceutical education in Europe while enjoying the bright Nordic summer nights with colleagues and friends. We heartily welcome you to Oslo.

Karen Marie Ulshagen
Director, School of Pharmacy, University of Oslo

Organizing Committee

EAFP executive Committee/ Scientific Committee

Marius Bergh	Jeffrey Atkinson (President)
Tom Caspersen	Ian Bates (Vice president)
Tor Gjøen	Benito Del Castillo Garcia (past president)
Mette Sollihagen Hauge	Filiz Hincal
Jan Karlsen	Stephen Hudson
Berit Smestad Paulsen	Panos Macheras
Knut E. Rasmussen	Annie Marcincal
Sverre Arne Sande	José Guimaraes Morais (General secretary)
Per Helge Tusvik	Bart Rombaut (Treasurer)
Karen Marie Ulshagen (Head)	Giuseppe Ronsisvalle
	Karen Marie Ulshagen
	Peep Veski

New Issues in Postgraduate / post registration Pharmacy Education

Final program

Thursday 18th June 2009

- 13:00 - 15:00 Registration and poster set-up
- 15:00 - 15:45 Opening ceremony
Jeffrey Atkinson, Karen Ulshagen, Inga Bostad (Vice rector, UiO)
- News on the PHARMINE consortium
Jeffrey Atkinson
- 15:45 - 18:15 Continuing education, Continuing Professional Development (CPD) and Life Long Learning (LLL)
Moderators: Mette Sollihagen Hauge and Giuseppe Ronsisvalle
- 15:45 - 16:00 Introduction
- 16:00-16:45 Continuing education for pharmacists – from a health authority perspective
Maria Linetti, Director, Continuing education for pharmacists, Italian Ministry of Health
- 16:45-17:15 Continuing education for community pharmacists in Denmark - the case of Master of drug management
Birthe Søndergaard, Associate Professor, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Copenhagen
- 17:15-17:30 Coffee break
- 17:30-17:45 Continuing pharmaceutical education and certificate programs in pharmacy – The US experience
Mike Rouse, Assistant Executive Director, International and Professional Affairs, US Accreditation Council for Pharmacy Education
- 17:45-18:15 Selected short presentations on Continuing education, CPD and LLL
Selected from submitted abstracts
- 18:45 20:30 Reception, Town Hall



Friday 19th June 2009

- 09:00 - 09:25 Legal framework for postgraduate education in the EU – Tension between European standardization and the needs of the sectoral professions
Berit Karseth, Professor of Social Sciences, University of Oslo
Moderator: Karen Ulshagen
- 09:25- 12:00 Postgraduate pharmacy education to meet the needs of industry. (Joint symposium with PHARMINE Work Program 5: Competency curriculum for industrial pharmacy)
Moderators: Bart Rombaut, Jane Nicholson
- 09:25-09:50 Future specialization for pharmacists in industry
Jane Nicholson, Executive Director European Industrial Pharmacists Group
- 09:50-10:15 Innovative medicines initiative, safety sciences curricula
Daan Crommelin, Scientific Director, Dutch Top Institute Pharma
- 10:15-10:40 New roles for industrial pharmacists within the economic framework of health care
Inger Näsman, Director, LIF - the research-based pharmaceutical industry in Sweden
- 10:40-11:10 Coffee break & poster session
- 11:10-12:00 Selected short presentations on postgraduate education in industrial pharmacy
Selected from submitted abstracts
- 12:00 - 13:00 Lunch
- 13:00 - 14:00 EAFP General assembly Elections
Jeffrey Atkinson, Jose Morais



Friday 19th June 2009 continues...

... Friday 19th June 2009 continues

- 14:00 - 16:45 Postgraduate pharmacy education to meet the needs of clinical pharmacy in hospital and community pharmacy
(Joint symposium with PHARMINE Work Program 4: Competency curriculum for clinical and hospital pharmacy)
Moderators: Ian Bates, António Melo Gouveia
- 14:00-14:25 Hospital and clinical pharmacist, present and future roles.
António Melo Gouveia, Director Pharmaceutical Service,
National Oncology Institute – Lisbon
- 14:25-14:50 Future specialization in clinical pharmacy.
Frank Jørgensen, President, European Society of Clinical Pharmacy
- 14:50-15:15 Postgraduate education in clinical pharmacy- from specialization led by professional organizations to an academic degree within the Bologna framework.
Espen Molden, Professor, School of Pharmacy, University of Oslo
- 15:15-15:45 Coffee break and poster session
- 15:45-16:45 Selected short presentations on postgraduate education in clinical and hospital pharmacy
Selected from submitted abstracts
- 16:45 - 17:00 Closing of EAFP conference
Jeffrey Atkinson, Karen Ulshagen
- 19:00 - 23:00 Social event, Fjord cruise with dinner



Saturday 20th June 2009 Meeting of the PHARMINE consortium

- 09:00 - 13:00 PHARMINE
Moderators: Jeffrey Atkinson, Bart Rombaut
<http://www.pharmine.org>
- 13:00 Lunch

Abstract submission guidelines

Abstract submission deadline:

1st April, 2009

Call for papers:

Papers to be presented (poster presentations or oral) are invited on the topic of pharmacy education. This year, participants are particularly invited to submit papers on postgraduate/post-registration pharmacy education (above the Bologna 2nd cycle level):

- Ph.D. programs in pharmacy
- Specialization programs
- Master on Master programs
- Continuing Professional Development/Life Long Learning

Please send your abstract (Microsoft Word format only) by e-mail to:

EAFP-abstracts@farmasi.uio.no

Please indicate in the main body of your e-mail whether you would prefer a talk or poster presentation.

Publication of abstracts:

- Following peer review, abstracts will be published in the electronic journal Pharmacy Education. Authors may be asked to edit their abstracts according to any conditions set by the scientific panel. The Scientific panel decision is final.

Social events

Reception, Town Hall

The Mayor of Oslo has invited us to a reception and guided tour in the Town Hall with drinks and light food included. Oslo Town Hall (Oslo Rådhus) is situated near the fjord, and the nearest metro station (T-bane) is "Nationaltheatret".



Fjord cruise with dinner

S/S Johanna, which was built in 1892, will take us onboard for a fjord cruise with shellfish and wine included. The ship has been restored and has the capacity to serve 130 guests indoors or outdoors, while sightseeing the Oslo fjord.
<http://www.nyc.no/johanna.html>



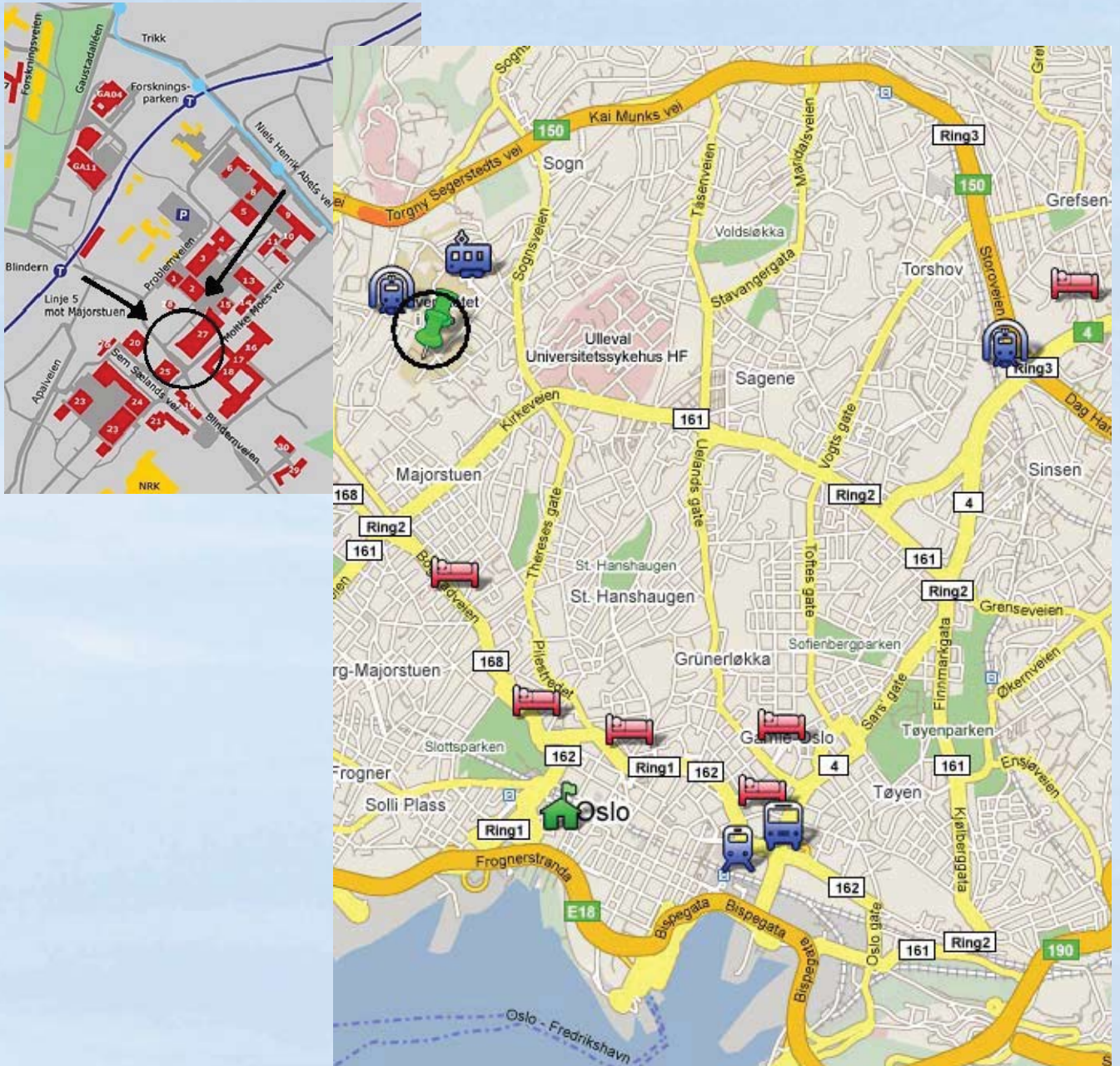
Registration fee

Full registration:	ca. 350 €	
On site registration:	ca. 400 €	
EAFP delegate:	ca. 300 €	(all delegates from an affiliated faculty)
Students:	ca. 100 €	(EAFP to cover 2 airline tickets for EPSA delegates)
Accompanying person:	ca. 50 €	

Registration form (for the conference, events and hotel booking)

<http://mm.event123.no/EAFP/09/>

Map of Oslo and University of Oslo (Blindern)



Oslo

The Capital of Norway

Transportation

Oslo Lufthavn - Gardermoen (OSL) is located 50 km north of Oslo
(<http://www.osl.no/en/osl>)

Connections between Oslo Lufthavn and Oslo city center

- by SAS flybussen (shuttle bus) to/from Oslo bussterminal: 43 minutes
(<http://www.flybussen.no/index.asp?lang=ENG>)
- by train (local or Flytog) to/from Oslo S (Oslo Sentralstasjon/Jernbanetorget)
(http://www.nsb.no/?lang=en_US; <http://www.flytoget.no/eng/>)

Connections between Oslo city center and Blindern (Universitetet i Oslo)

- by metro/subway (T-bane): line 3, 4 or 5: ca. 8 minutes
- by tram (trikk): line 17 or 18: ca. 17 minutes
(<http://ruter.no/Rutetilbud/>)

Tourist Information

visit Oslo (<http://www.visitoslo.com/en/>)

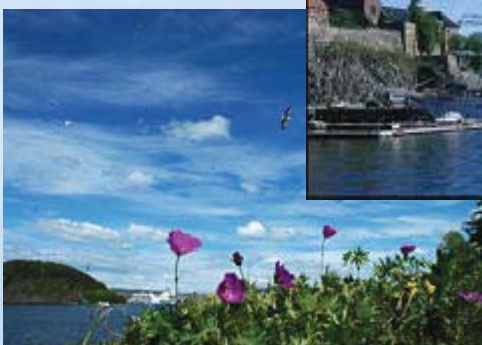
Visit Norway.com (<http://www.visitnorway.com/en/>)



Farmasøytisk institutt, UiO
Sem Sælandsvei 3, Oslo

Postboks 1068 Blindern
N-0316 Oslo – Norway

Phone: +47 22 85 65 85
<http://www.farmasi.uio.no>



This is Oslo

ILOŚCIOWA OCENA mRNA TGFβ1 I JEGO RECEPTORÓW W KWALIFIKACJI CHORYCH Z PRZEWLEKŁYM ZAPALENIEM WĄTROBY TYPU B DO LECZENIA INTERFERONEM α

QUANTITATIVE ANALYSIS OF TGFβ1 mRNA AND ITS RECEPTORS IN THE QUALIFICATION OF PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B FOR THE INTERFERON α TREATMENT

Barbara Strzałka-Mrozik

Katedra i Zakład Biologii Molekularnej Wydziału Farmaceutycznego i Oddziału Medycyny Laboratoryjnej,
Śląski Uniwersytet Medyczny
Kierownik Katedry i Zakładu Biologii Molekularnej: Dr hab. n. med. Urszula Mazurek

Streszczenie

Transformujący czynnik wzrostu β - to plejotropowa cytokina odgrywająca istotną rolę w regulacji wzrostu, różnicowania lub apoptozy komórek. Celem pracy było wyznaczenie profilu ekspresji genów TGFβ1 i jego receptorów TβRI, TβRII, TβRIII w monojądrzastych komórkach krwi obwodowej (PBMC) u chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B. Liczbę cząsteczek mRNA badanych genów wyznaczono techniką QRT-PCR czasie rzeczywistym. Stwierdzono znamienne statystycznie różnice w ekspresji mRNA TGFβ1, TβRI i TβRII u chorych na pzwz typu B w porównaniu z grupą kontrolną. Zaobserwowano również występowanie korelacji pomiędzy ilością mRNA TGFβ1 i jego receptorów TβRI, TβRII u chorych kwalifikowanych do leczenia. Aktywność transkrypcyjna TGFβ1 w PBMC u chorych kwalifikowanych do leczenia interferonem α może stanowić dodatkowy marker w ocenie stopnia aktywności zapalnej w wątrobie.

Słowa kluczowe: przewlekłe zapalenie wątroby typu B, włóknienie wątroby, TGFβ1 mRNA, receptory TGFβ, QRT-PCR

Summary

Transforming growth factor β is a multifunctional cytokine, has wide biological actions including growth, differentiation, and cell apoptosis. The aim of this study was to investigate the expression of TGFβ1, and their receptors TβRI, TβRII, TβRIII E genes in peripheral blood mononuclear cells taken from patients with chronic hepatitis B and from the individuals in the control group. Transcriptional activity of studied genes was estimated by the use of real time QRT-PCR technique. The expression of TGFβ1, TβRI and TβRII genes was significantly higher in the group of patients with chronic virus hepatitis B compared with controls. Additionally, strong correlation between expression of TGFβ1 gene and their receptors TβRI, TβRII in patients with chronic hepatitis B was determined.

The transcriptional activity of TGFβ1 in PBMC may be a useful marker for differentiating patients treated with α-interferon who had differ a degree of inflammatory activity in liver.

Keywords: chronic hepatitis B, liver fibrosis, TGFβ1 mRNA, TGFβ receptors, QRT-PCR

Wstęp

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV) pozostaje stale jedną z najczęstszych przyczyn przewlekłych chorób wątroby. Choć szeroko wprowadzane programy profilaktyki czynnej wyraźnie zmniejszyły liczbę nowych zachorowań, to jednak w skali globalnej problem przewlekłego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B (pzwz typu B) dotyczy około 350-400 milionów osób i jest jednym z głównych problemów zdrowia publicznego [1-3].

Częstość występowania zakażenia HBV, poważne konsekwencje dla zdrowia i życia chorego wynikające z nie-

wydolności wątroby oraz możliwości rozwoju raka wątroby [4] powodują poszukiwanie skutecznych procedur terapeutycznych oraz czynników diagnostyczno-prognostycznych umożliwiających właściwą kwalifikację chorych do leczenia i indywidualizację metod stosowanej terapii.

Obecnie programy badawcze dotyczące patogenezy przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby skupiają się wokół szeregu cytokin biorących udział w tym procesie, próbując wyjaśnić ich rolę, mechanizm działania i kierunek zmian, do których prowadzą. Spośród czynników wzrostowych udowodnione znaczenie w tych procesach ma m. in. transformujący czynnik wzrostu β1 (TGFβ1) [5].

Parametr	n= 42
Płeć (K/M)	14/28
Wiek (lata)	45,9
Stopień włóknienia (F2/F3)	36/6
Stopień aktywności zapalnej (A2-A4)	22-15-5
ALAT [IU/L]	114,0
AspAT [IU/L]	77,0
bilirubina [mg/dl]	0,85
GGTP [IU/L]	22,0

Tabela I. Charakterystyka chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu B

TGFβ1 odgrywa istotną rolę w procesach włóknienia [6], transformacji nowotworowej i przerzutowania [7] oraz w procesach angiogenezy [8]. W piśmiennictwie spotyka się informacje o zależności pomiędzy stopniem ekspresji w tkance wątrobowej genu kodującego TGFβ1, a stężeniem białka TGFβ1 w osoczu [7, 9], brak natomiast danych na temat korelacji pomiędzy ilością mRNA TGFβ1 w krwi obwodowej a stopniem zaawansowania włóknienia i dynamiką zmian zapalnych w wątrobie.

Biorąc pod uwagę, że cytokiny działają miejscowo -autokrynnie, pobudzając swoiste receptory na komórkach macierzystych, cennych informacji o stanie chorego może dostarczyć ilościowa ocena mRNA TGFβ1 i jego receptorów w zmianach zapalnych wątroby [10, 11].

Celem pracy było wyznaczenie profilu ekspresji genów kodujących TGFβ1 i jego receptory TβRI, TβRII, TβRIII oraz ocena relacji ilościowych pomiędzy analizowanymi transkryptami we krwi obwodowej u chorych na przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B kwalifikowanych do leczenia interferonem.

Materiał i metody

Badaniami objęto grupę 42 chorych (14 kobiet i 28 mężczyzn), średni wiek 45 lat, z rozpoznaniem przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B kwalifikowanych do leczenia interferonem α (Tabela I). Wszyscy chorzy byli wstępnie hospitalizowani w Klinice Chorób Zakaźnych w Chorzowie. W zależności od stopnia aktywności zapalnej w wątrobie grupę chorych typowanych do leczenia podzielono na dwie podgrupy: I - grupa (20 osób) aktywność zapalna ≥ 3 punkty, II - grupa (22 osoby) aktywność zapalna <3 punkty w czteropunktowej skali Scheuera [12] w modyfikacji Gabriela [13].

U chorych z pzwz typu B kryteria włączenia do badań były następujące:

- okres obserwacji dłuższy niż 6 miesięcy od momentu wykrycia zakażenia,
- potwierdzenie histopatologicznie zmian zapalnych w biopsji wątroby (zmiany o nasileniu większym niż przewlekłe minimalne zapalenie wątroby, stopień włóknienia F2-F3),
- podwyższona co najmniej dwukrotnie i nie więcej niż pięciokrotnie w stosunku do normy aktywność aminotransferaz (ALAT, AspAT) we krwi, stwierdzona co najmniej trzykrotnie w ciągu półrocznego okresu obserwacji,
- obecność antygeny HBe w surowicy oraz potwierdzenie obecności DNA HBV we krwi.

Kryteria wyłączenia chorych obejmowały: niewyrównaną marskość wątroby, niewyrównaną cukrzycę, niewyrównaną czynność tarczycy, niewydolność nerek, niewydolność krążenia, ciężką depresję, choroby autoimmunologiczne, reumatoidalne, współwystępowanie zakażenia HCV, nadużywanie alkoholu lub narkotyków. U chorych tych w ciągu ostatniego roku nie stosowano leczenia przeciwwirusowego, immunomodulującego lub terapii glikokortykosteroidami.

U wszystkich chorych przed rozpoczęciem leczenia, wykonano badania biochemicznych wykładników funkcji wątroby (poziom bilirubiny, aktywność ALAT, AspAT, GGTP), badanie w kierunku anty-HCV oraz oligobiopsję wątroby wykorzystując zestaw Hepafix^R (Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany).

Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych ochotników (12 kobiet i 18 mężczyzn; średni wiek 39 lat) z prawidłowymi wartościami badań biochemicznych, takich jak: aktywność aminotransferaz, fosfatazy zasadowej, GGTP, prawidłowe stężenie bilirubiny, glukozy, mocznika oraz kreatyniny we krwi. U osób tych nie stwierdzono obecności antygeny HBe w badaniach serologicznych oraz nie potwierdzono obecności HBV DNA i HCV RNA we krwi. Przeprowadzono również badanie czynności tarczycy (stężenie TSH i fT4) oraz badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej. Badani ochotnicy zostali poinformowani o celu i sposobie przeprowadzenia badania oraz podpisali formularz świadomej zgody na uczestnictwo w badaniu.

U wszystkich badanych krew w ilości ok. 7 ml pobierano z żyły łokciowej rano o godz. 8⁰⁰ na 0,5 M roztwór EDTA, pH = 8,0 (125 ml roztworu EDTA na 5 ml krwi; 1,5 mg EDTA na ml krwi). Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) otrzymywano przez wirowanie z użyciem odczynnika Ficoll-Conray (Immunobiological Co., Gumma, Japan).

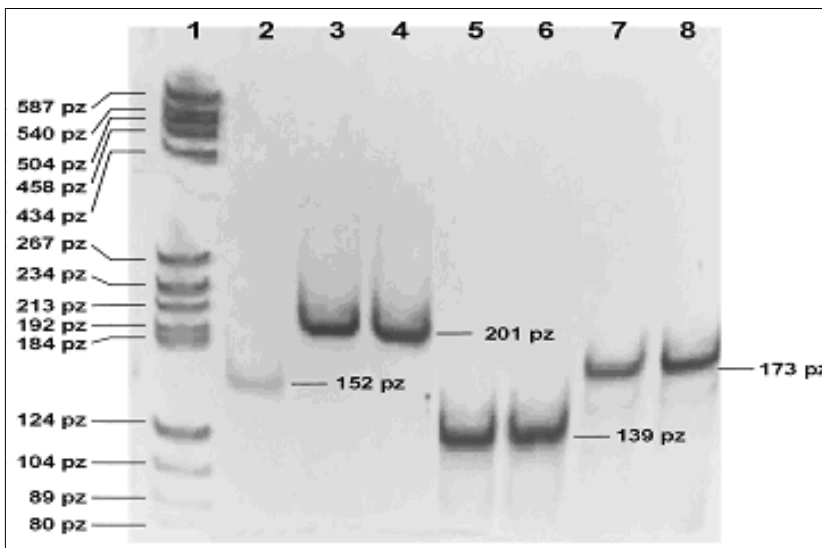
Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach (NN-013-84/01).

Ekstrakcja kwasu rybonukleinowego

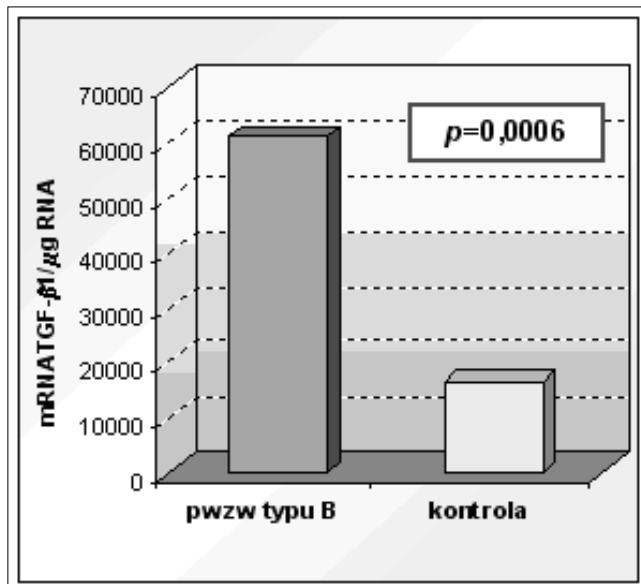
Ekstrakcję RNA z PBMC przeprowadzono przy użyciu zestawu odczynników do izolacji całkowitego RNA (Total RNA Prep Plus Kit, A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) zgodnie z zaleceniami producenta. Stężenie wyizolowanego RNA oraz stopień jego czystości był oceniany na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych dokonanych na kalkulatorze DNA/RNA Gene-Quant Pro (Amersham Pharmacia Biotech AB).

Reakcja QRT-PCR dla mRNA TGFβ1 i jego receptorów TβRI, TβRII, TβRIII

Aktywność transkrypcyjną badanych genów oceniano na podstawie analizy kinetyki reakcji RT-PCR z zastosowaniem zestawu odczynników SYBR Green Quantitect RT-PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) oraz detektora sekwencji OpticonTM DNA Engine Sequence Detector (MJ Research Inc., Watertown, MA, USA). Wykorzystano sekwencje starterów zaprojektowane i opublikowane przez Strzałka i wsp. [8]. Odwrotną transkrypcję (RT) prowadzo-



Rycina 1. Przykładowy elektroforegram przedstawiający rozdział produktów reakcji QRT-PCR w 6% żelu poliakrylamidowym barwionym solami srebra. Ścieżka 1 – marker wielkości – plazmid pBR 322/Hae III, ścieżka 2 – amplimer TGFβ1 (152 pz), ścieżki 3 i 4 – amplimer TβRI (201 pz), ścieżki 5 i 6 – amplimer TβRII (139 pz), ścieżki 7 i 8 – amplimer TβRIII (173pz).



Rycina 2. Profil ekspresji mRNA TGF-β1 w krwi obwodowej u chorych na pwzw typu B kwalifikowanych do leczenia interferonem α oraz u osób zdrowych (kontrola) Poziom istotności wyznaczono testem U Manna-Whitneya. Wysokość słupka odpowiada wartości mediany.

no w temperaturze 50°C przez 30 minut, natomiast amplifikację prowadzono w warunkach temperaturowych: 95°C przez 15 minut; 50 dwustopniowych cykli: 95°C przez 30 sekund i 60°C przez 60 sekund oraz końcowe wydłużanie 72°C przez 10 minut. Każda reakcja przeprowadzona była w trzech powtórzeniach.

Dla wszystkich prób badanych była wykonywana również reakcja QRT-PCR dla mRNA genu β-aktyny, mająca potwierdzić natywność ekstraktu RNA w przypadku ewentualnego braku/inhibicji ekspresji badanych genów. Specyficzność reakcji RT-PCR potwierdzono techniką elektroforezy w 6% żelu poliakrylamidowym barwionym solami srebra (Rycina 1.) oraz wyznaczeniem temperatury topnienia produktów PCR.

Analiza statystyczna: Wyniki badań poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem licencjonowanej wersji programu Statistica v.7.1 PL dla poziomu istotności $p < 0,05$. W odniesieniu do badanych cech wykazano istotne odstępstwo od rozkładu normalnego. Istnienie różnic weryfikowano za pomocą testu U Manna-Whitneya (dla dwóch prób niezależnych). Do scharakteryzowania badanych cech, wobec stosowania metod nieparametrycznych, zastosowano medianę jako miarę średnią i odstęp międzykwartyłowy (kwartył I i kwartył III).

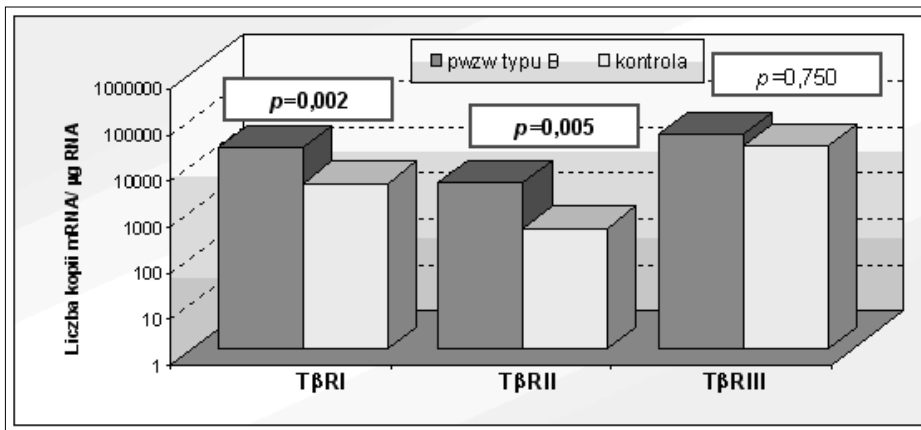
Wyniki

Miarą aktywności transkrypcyjnej genów kodujących TGFβ1 oraz jego receptory TβRI, TβRII i TβRIII była liczba cząsteczek mRNA przeliczona na 1 μg całkowitego RNA wyekstrahowanego z 1 ml krwi.

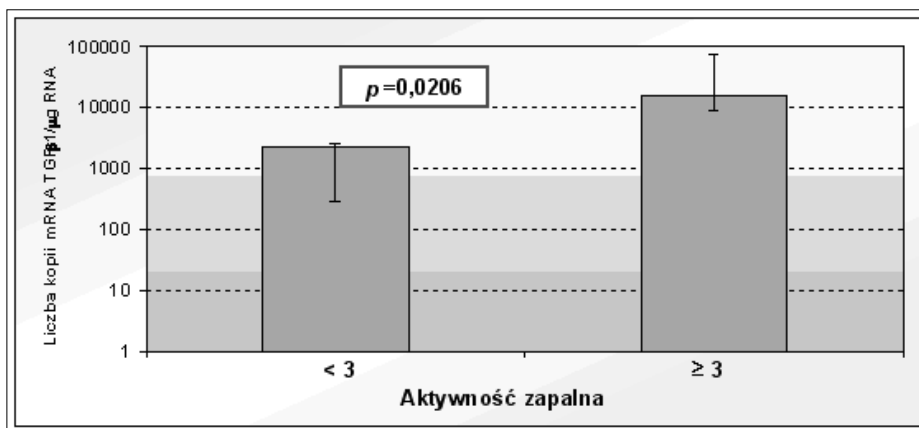
W pierwszym etapie badań oceniono aktywność transkrypcyjną genu kodującego TGFβ1 w krwi obwodowej u chorych na pwzw typu B i u osób zdrowych. Stwierdzono, zwiększoną ekspresję mRNA TGFβ1 w krwi obwodowej u chorych na pwzw typu B w porównaniu z grupą kontrolną (test U Manna-Whitneya, $p < 0,001$) (Rycina 2).

W dalszej części badań dokonano oceny aktywności transkrypcyjnej genów kodujących receptory TβRI, TβRII i TβRIII w krwi obwodowej u chorych na pwzw typu B kwalifikowanych do leczenia oraz w krwi obwodowej grupy kontrolnej. Przeciętnie, liczba kopii mRNA TβRI dla osób HBV dodatnich wynosiła 24360,0 cząsteczek mRNA/μg RNA, podczas gdy u osób zdrowych ekspresja tego genu była niższa (Me = 3967,0 cząsteczek mRNA/μg RNA). W przypadku receptora TβRII aktywność transkrypcyjna u osób kwalifikowanych do leczenia interferonem była znacznie wyższa (Me = 4002,0 kopii mRNA/μg RNA) niż w przypadku osób z grupy kontrolnej (Me = 425,0 cząsteczek mRNA/μg RNA). Różnice w ekspresji, mRNA TβRI, i TβRII, w krwi obwodowej u chorych na pwzw typu B i u osób zdrowych były znamienne statystycznie (test U Manna-Whitneya; $p < 0,05$). Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnej różnicy w ekspresji mRNA receptora TβRIII w badanych grupach (test U Manna-Whitneya; $p > 0,05$) (Rycina 3).

Wyznaczone profile stężeń dla mRNA TGFβ1 oraz dla jego trzech receptorów posłużyły do określenia wzajemnych powiązań pomiędzy nimi u chorych na pwzw typu B kwalifikowanych do leczenia interferonem α (Tabela II). Należy podkreślić, że korelacja ilości mRNA TGF-β1/μgRNA i ilości mRNA receptora TβRII/μgRNA była korelacją istotną statystycznie. Wykazano również, istnienie istotnej statystycznie, ujemnej zależności pomiędzy ilością mRNA TGF-β1/μgRNA i ilością mRNA receptora TβRI/μgRNA. Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnej korelacji pomiędzy aktywnością transkrypcyjną genu TGF-β1 a ilością mRNA TβRIII.



Rycina 3. Profil ekspresji mRNA receptorów TβRI, TβRII i TβRIII w krwi obwodowej u chorych na pzwz typu B kwalifikowanych do leczenia interferonem α oraz u osób zdrowych (grupa kontrolna). Poziom istotności wyznaczono testem U Manna-Whitneya. Wysokość słupka odpowiada wartości mediany.



Rycina 4. Aktywność transkrypcyjna TGF-β1 w krwi obwodowej u chorych na pzwz typu B kwalifikowanych do leczenia interferonem α z wątrobową aktywnością zapalną mniejszą od 3 oraz większą lub równą 3 punkty w czteropunktowej skali Scheuera. Poziom istotności wyznaczono testem U Manna-Whitneya. Wysokość słupka odpowiada wartości mediany, a zaznaczony przedział rozstępowi kwartylowemu.

Korelowane cechy	Liczebność	Test korelacji rang Spearmana		
		r	t	p
TGFβ1 średnia - TβRI średnia	42	-0,5298	-2,5758	0,0196
TGFβ1 średnia - TβRII średnia	42	0,6614	3,6359	0,0020
TGFβ1 średnia - TβRIII średnia	42	0,1091	0,3292	0,7495

Tabela. II. Wyniki weryfikacji statystycznej oraz wartości współczynnika korelacji rang Spearmana dla ilości mRNA TGFβ1 i ilości mRNA jego receptorów TβRI, TβRII, TβRIII u chorych na pzwz typu B kwalifikowanych do leczenia interferonem α

W kolejnym etapie badań podjęto próbę określenia wzajemnych powiązań pomiędzy aktywnością transkrypcyjną TGFβ1 i jego receptorów w krwi obwodowej a parametrami oznaczanymi w biopsjach wątroby (stopień aktywności zapalnej i stopień włóknienia wątroby) w trakcie kwalifikacji do leczenia interferonem α. Analizując liczbę cząstek mRNA TGFβ1 u chorych na pzwz typu B kwalifikowanych do leczenia z aktywnością zapalną w wątrobie < niż 3 punkty, należy oczekiwać wyników zbliżonych do 1000 kopii mRNA/μg RNA, natomiast w przypadku chorych, u których wątrobowa aktywność zapalna będzie ≥ od 3 punkty w skali Scheuera należy oczekiwać aktywności transkrypcyjnej TGFβ1 zbliżonej do 10 000 kopii mRNA/μg RNA (test U Manna-Whitneya, $p < 0,05$) (Rycina 4). Zależności takiej nie odnotowano w stosunku do stopnia włóknienia

wątroby (test U Manna-Whitneya, $p > 0,05$). Nie stwierdzono również statystycznie istotnych korelacji pomiędzy parametrami oznaczanymi w biopsjach wątroby a aktywnością transkrypcyjną receptorów TβRI, TβRII, TβRIII (test U Manna-Whitneya, $p > 0,05$).

Dyskusja

Indywidualizacja terapii coraz częściej połączona jest z poszukiwaniem nowych markerów diagnostyczno-prognostycznych. Biorąc pod uwagę, że zmiany profilu ekspresji genów często wyprzedzają zmiany w obrazie histopatologicznym wątroby należy założyć, że poznanie profilu stężeń genów kodujących TGFβ1 i jego receptory może być dodatkowym źródłem informacji o znaczeniu diagnostycznym, a także może być podstawą do prognozowania dalszego przebiegu infekcji HBV oraz właściwej kwalifikacji do leczenia.

Biopsja wątroby należy do standardów diagnostycznych i kwalifikacyjnych do leczenia u chorych na pzwz typu B. Istnieją jednak opinie, iż ocena stopnia aktywności zapalnej i stopnia włóknienia w wątrobie, jedynie na podstawie badania histopatologicznego biopsji jest niepełna i pomijając subiektywne aspekty tego badania, nie daje możliwości pełnego wglądu w dynamikę zachodzących tam procesów. Często powtarzanie biopsji wątroby w celu monitorowania postępu choroby czy też efektów stosowanego leczenia napotyka duże trudności.

W procesie fibrogenyzy wątrobowej, na który składa się proliferacja komórek oraz akumulacja składników macierzy pozakomórkowej, istotną rolę odgrywa TGFβ1 – czynnik stymulujący i aktywujący komórki gwiazdiste [14, 15]. Nasilenie ekspresji TGFβ1 następuje w stanach wymagających uaktywnienia procesów naprawczych, wynikających np. z przebytego zapalenia [11]. Są doniesienia, które potwierdzają korelację pomiędzy stopniem ekspresji TGFβ1 w tkance wątrobowej a stężeniem tej cytokiny w surowicy u chorych z przewlekłymi chorobami wątroby [16]. Wiele odkryć donosi o podwyższonych poziomach TGFβ1 w osoczu oraz w moczu u chorych na pzwz typu B lub C [6, 17], co znajduje również potwierdzenie w wynikach badań własnych. Autorzy większości publikacji oznaczają

jedynie stężenie białka TGFβ1 metodami immunoenzymatycznymi, najczęściej stosując technikę ELISA. Należy jednak zwrócić uwagę, że zmiany stężenia białka - końcowego produktu translacji, poprzedza zmiana aktywności transkrypcyjnej genu kodującego to białko. Dlatego też celowym wydaje ilościowe oznaczenie poziomu mRNA genu kodującego dane białko.

W przedstawionej pracy wykorzystując technikę QRT-PCR w czasie rzeczywistym, oceniono aktywność transkrypcyjną genów kodujących TGFβ1 i jego trzy receptory w krwi obwodowej u chorych z przewlekłą infekcją HBV i w krwi osób zdrowych. Uzyskane wyniki pozwalają wnioskować, iż ekspresja genu kodującego TGFβ1 w krwi obwodowej u chorych na pzwz typu B utrzymuje się na wyższym statystycznie istotnym poziomie, przeciętnie $6,12 \times 10^4$ kopii mRNA/μgRNA w porównaniu z grupą kontrolną - $1,60 \times 10^4$ kopii mRNA/μgRNA. W badaniach Flisiaka i wsp. [18] średnie stężenie TGFβ1 oznaczone w surowicy chorych na pzwz typu B przekraczało 29,6 ng/ml, podczas gdy w pracy Marka i wsp. [4] średnie stężenie TGFβ1 wyznaczone w surowicy chorych na pzwz typu C kwalifikowanych do leczenia interferonem wynosiło 36,7 ng/ml. W dostępnym mi piśmiennictwie nie znajdowano natomiast danych dotyczących liczby cząsteczek mRNA TGFβ1 w krwi obwodowej u chorych na pzwz typu B.

Zakażenie HBV, podobnie jak inne czynniki uszkadzające wątrobę, może nasilać stan zapalny i postęp włóknienia wątroby, co z kolei wiąże się z wzmożoną ekspresją TGFβ1 [18]. Proces ten prowadzi do zmian morfologicznych i czynnościowych w komórkach gwiazdzistych wątroby, które w wyniku transformacji do miofibroblastów stają się źródłem białek macierzy pozakomórkowej, głównie kolagenu i fibronektyny. Ponadto TGFβ1 hamuje syntezę enzymów proteolitycznych biorących udział w degradacji białek macierzy pozakomórkowej - ECM oraz nasila ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję inhibitorów metaloproteinaz [14, 18]. Dlatego też celowym wydawało się sprawdzenie zależności pomiędzy liczbą cząsteczek mRNA TGFβ1 w krwi obwodowej u chorych na pzwz typu B a stopniem zawansowania zmian zapalnych i dynamiką procesu włóknienia w wątrobie.

Badania przeprowadzone przez Neumana i wsp. [9], dowiodły istnienia statystycznie istotnej zależności pomiędzy surowiczym poziomem TGFβ1 a stopniem włóknienia w wątrobie u chorych z przewlekłą infekcją HCV. W grupie chorych ze stopniem włóknienia wątrobowego 1 w skali Knodell'a Neumana i wsp. [9] obserwowali średnio $9,0 \pm 0,5$ ng TGFβ1 w 1ml surowicy, natomiast u osób ze stopniem włóknienia 2 średni poziom TGFβ1 w surowicy wynosił 24 ± 2 ng/ml. W przypadku osób, u których nie dochodziło do progresji włóknienia wątrobowego, poziom omawianej cytokiny w surowicy pozostawał niezmienny. Bazując na uzyskanych wynikach Neuman i wsp. [9] stwierdzili, że pomiar poziomu TGFβ1 w surowicy osób z przewlekłą infekcją HCV może służyć jako nieinwazyjny marker w ocenie stopnia włóknienia wątroby u tych chorych.

Podobne spostrzeżenia poczyniła m. in. Calabrese i wsp. [5], która zanotowała statystycznie istotną zależność pomiędzy stopniem włóknienia i aktywnością zapalną w wątrobie a stężeniem TGFβ1 w komórkach mięsnych wątroby

u chorych na pzwz typu B oraz u chorych z marskością wątroby. Przytoczone powyżej wyniki badań są częściowo zgodne z obserwacjami własnymi, w których zanotowano istotną zależność pomiędzy aktywnością transkrypcyjną TGFβ1 w krwi obwodowej a stopniem aktywności zapalnej w wątrobie u chorych na pzwz typu B, nie stwierdzono jednak takiej zależności w stosunku do stopnia włóknienia wątroby.

Biorąc pod uwagę, że cytokiny działają miejscowo -autokrynnie, pobudzając swoiste receptory na komórkach macierzystych [8] cennych informacji o stanie chorego może dostarczyć analiza profilu ekspresji genów kodujących TGFβ1 i jego receptory TβRI, TβRII oraz TβRIII zwłaszcza, że w dostępnym piśmiennictwie napotkano tylko nieliczne prace dotyczące tego zagadnienia [5, 19].

W badaniach własnych zaobserwowano, że istnieje dodatnia korelacja pomiędzy ilością mRNA TGFβ1 a ilością mRNA receptora TβRII w krwi obwodowej u chorych na pzwz typu B, a ponadto stwierdzono większą aktywność transkrypcyjną receptora TβRII w krwi obwodowej u chorych w porównaniu z grupą kontrolną. Uzyskane wyniki były zgodne z wynikami badań Calabrese i wsp. [5], która zanotowała zwiększoną ekspresję TGFβ1 korelującą z podwyższonym poziomem mRNA TβRII w wątrobie u chorych na pzwz typu B lub C.

Oceniając aktywność transkrypcyjną receptora TβRI w krwi obwodowej u chorych na pzwz typu B zauważono, że występuje tu ujemna korelacja pomiędzy ilością mRNA receptora TβRI a ilością mRNA TGFβ1. Różnice w ekspresji mRNA receptora TβRI w krwi obwodowej u chorych na pzwz typu B i u osób zdrowych były znamienne statystycznie. Zależności takich nie odnotowano w przypadku receptora TβRIII. Dla porównania Roulot i wsp. [19] podaje, że obserwowano zmniejszoną ekspresję receptora TβRII i jednocześnie zwiększoną ekspresję receptora TβRI po zadziałaniu czynnika uszkadzającego jednakże w wątrobie u szczurów.

Podsumowując przegląd piśmiennictwa oraz wyniki badań własnych należy zauważyć, że wyższa aktywność transkrypcyjna genu kodującego TGFβ1 w krwi obwodowej u chorych na pzwz typu B koreluje z ekspresją genów kodujących receptory TβRI, TβRII i może stanowić marker różnicujący chorych kwalifikowanych do leczenia interferonem α ze stopniem aktywności zapalnej w wątrobie < lub ≥ niż 3 punkty w czteropunktowej skali Scheuera. Istnieje jednakże potrzeba szeroko zakrojonych badań, przeprowadzonych na dużych grupach w celu ostatecznego potwierdzenia przydatności oznaczeń TGFβ1 we krwi w kwalifikacji chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu B do leczenia interferonem.

Piśmiennictwo

1. Pawłowska M, Halota W: Charakterystyka zakażeń HBV i HCV u dzieci. *Med Sci Rev Hepatologia* 2006; 17-20.
2. Kanwal F i wsp.: Treatment alternatives for chronic hepatitis B virus infection: a cost-effectiveness analysis. *Ann Intern Med* 2005; 142: 821-31.
3. Strzałka B: Interferon w leczeniu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B. *Farm Przegl Nauk* 2006, 1: 21-24.

4. Marek B i wsp.: TGF- β 1 mRNA expression in liver biopsy specimens and TGF- β 1 serum levels in patients with chronic hepatitis C before and after antiviral therapy. *J Clin Pharm Ther* 2005; 30: 271-77.
5. Calabrese F i wsp.: Parenchymal transforming growth factor beta-1: Its type II receptor and Smad signaling pathway correlate with inflammation and fibrosis in chronic liver disease of viral etiology. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 1302-08.
6. Flisiak i wsp.: Plasma transforming growth factor beta1, metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in acute viral hepatitis type B. *Regul Pept* 2005; 131: 54-58.
7. Dong Z i wsp.: Clinical impact of plasma TGF- β 1 and circulating TGF- β 1 mRNA in diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008; 7: 288-95.
8. Strzałka B i wsp.: Ilościowa ocena mRNA TGF β izoform i ich receptorów w zdrowej tkance rogówki. *Farm Przegł Nauk* 2008; 4: 4-7.
9. Neuman M. i wsp.: Kinetics of serum cytokines reflects changes in the severity of chronic hepatitis C presenting minimal fibrosis. *J Viral Hepat* 2002; 9: 134-40.
10. Nakamura H i wsp.: RNA interference targeting transforming growth factor- β type II receptor suppresses ocular inflammation and fibrosis. *Mol Vis* 2004; 10: 703-11.
11. Stalińska L, Ferenc T: Rola TGF- β w regulacji cyklu komórkowego. *Postepy Hig Med Dosw* 2005; 59: 441-49.
12. Scheuer P. J: Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *J Hepatol* 1992; 15: 567-71.
13. Gabriel A, Ziolkowski A: New terminology of chronic hepatitis including scoring scale. *Med Sci Monit* 1997; 3: 113.
14. Flisiak R i wsp.: Effect of lamivudine treatment on plasma levels of transforming growth factor β 1, tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and metalloproteinase-1 in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2661-65.
15. Castellano-Higuera A i wsp.: Cytokines and lipid peroxidation in alcoholics with chronic hepatitis C virus infection. *Alcohol & Alcoholism* 2008; 43: 137-42.
16. Akpolat N i wsp.: Relationship between serum cytokine levels and histopathological changes of liver in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3260-63.
17. Sung J i wsp.: Relationship of clinical and virological factors with hepatitis activity in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2002; 68: 182- 87.
18. Flisiak i wsp.: Effect of lamivudine treatment on plasma levels of transforming growth factor β 1, tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and metalloproteinase-1 in patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2004;10: 2661-65.
19. Roult D i wsp.: Role of Transforming Growth Factor β Type II Receptor in Hepatic Fibrosis: Studies of Human Chronic Hepatitis C and Experimental Fibrosis in Rats. *Hepatology* 1999; 29: 1730-38.

Adres do korespondencji:

Dr Barbara Strzałka-Mrozik

Katedra i Zakład Biologii Molekularnej Wydziału Farmaceutycznego i Oddziału Medycyny Laboratoryjnej,

Śląski Uniwersytet Medyczny, 41-200 Sosnowiec, ul. Narcyzów 1,

tel.: 00 48 032 364 10 26, fax: 00 48 032 364 10 20, e-mail: bstrzalka@sum.edu.pl

Molekularne podstawy aktywności farmakologicznej i toksyczności paracetamolu

Molecular basis of the pharmacological activity and toxicity of acetaminophen

Sławomir Smolik, Ludmiła Węglarz
Katedra i Zakład Biochemii, Śląski Uniwersytet Medyczny
Kierownik placówki naukowej: prof. dr hab. n. med. Ludmiła Węglarz

Streszczenie

Przedawkowanie paracetamolu i będące jego wynikiem uszkodzenia wątroby stanowią ważny problem kliniczny, a mechanizm indukowanej przez ten lek hepatotoksyczności jest przedmiotem intensywnych badań i spornych dyskusji od ponad 30 lat. Niedawno przeprowadzone badania sugerują, że tworzenie reaktywnych metabolitów, wyczerpanie rezerw glutationu i alkilacja białek mitochondrialnych są kluczowymi wydarzeniami inicjującymi działanie toksyczne paracetamolu. Zjawiska te prowadzą do zaburzenia w znacznym stopniu funkcjonowania mitochondriów, wyczerpania rezerw ATP, nasilonej fragmentacji DNA oraz modyfikacji wielu białek wewnątrzkomórkowych, co prowadzi w ostateczności do onkocyjnej i apoptocycznej śmierci komórek wątroby. Mechanizm działania paracetamolu jest wciąż niecałkowicie zrozumiały. Paracetamol jest uważany za słaby inhibitor syntezy prostaglandyn. Sugeruje się, że COX-3, produkt alternatywnego składania transkryptu COX-1 jest punktem uchwytu działania leku, ale badania genomowe i kinetyczne nie wskazują na istotność kliniczną tego oddziaływania. Ponadto badania biochemiczne wskazują na znaczenie układu serotonergicznego w działaniu paracetamolu poprzez jego niebezpośrednie oddziaływanie na ten układ. Niedawne prace wykazały także, że układ opioidowy i kanabinoidowy są istotne w działaniu analgetycznym paracetamolu. Lek ten ulega tej przemianie metabolicznej do arachidonylofenolaminy (AM404), stanowiącej ligand dla receptorów CB1 i będącej inhibitorem wychwytu anandamidu.

Słowa kluczowe: acetaminofen, paracetamol, mechanizm działania, hepatotoksyczność

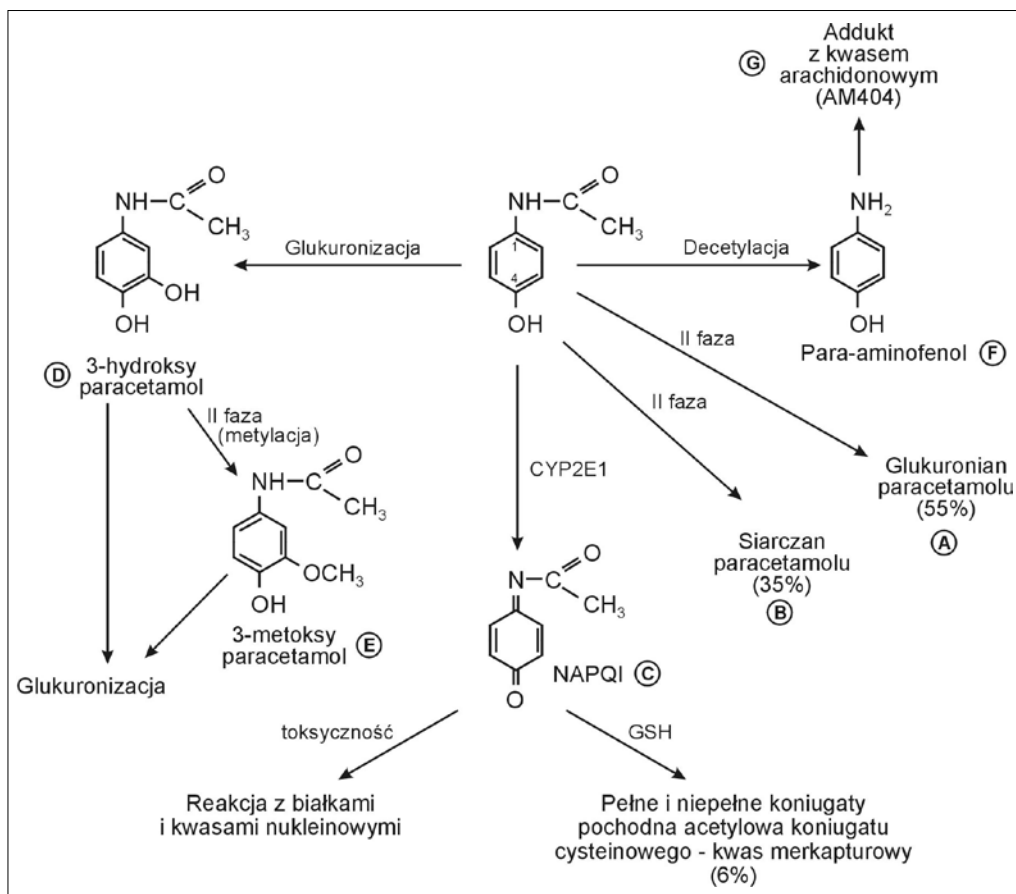
Abstract

Acetaminophen overdose and the resulting hepatotoxicity are important clinical problems and the mechanisms of acetaminophen-induced liver cell injury have extensively been investigated and controversially discussed for over 30 years. Recent studies suggest that reactive metabolites formation, glutathione depletion and alkylation of mitochondrial proteins are crucial initiating events in acetaminophen toxicity. These events lead to the massive mitochondrial dysfunction and ATP depletion, extensive DNA fragmentation and the modification of the intracellular proteins, all of which contribute to the oncotic and apoptotic cell death in the liver. The mechanism of action of acetaminophen is still not clearly understood. Acetaminophen is generally considered to be a weak inhibitor of the synthesis of prostaglandins. COX-3, a splice variant of COX-1, has been suggested to be the site of action of paracetamol, but genomic and kinetic analyses indicate that this selective interaction is unlikely to be clinically relevant. Modulation of the serotonergic system has also been suggested on the basis of biochemical studies supporting acetaminophen indirect serotonergic effect. Recent studies suggest that endocannabinoid and opioidergic systems are involved in acetaminophen-induced analgesia. Paracetamol undergoes a metabolic transformation to N-arachidonylphenolamine (AM404), a CB1 receptor ligand and anandamide uptake inhibitor.

Key words: acetaminophen, paracetamol, mechanism of action, hepatotoxicity

Paracetamol należy do chemicznych pochodnych aniliny znanych z właściwości przeciwgorączkowych oraz zdolności do wywoływania methemoglobinemii po zastosowaniu dużych dawek. Spośród hydroksylowanych pochodnych aniliny zwanych aminofenolami (para, meta i orto), izomer para wykazuje najmniejszą toksyczność. Próby otrzymania pochodnych p-aminofenolu o mniejszej toksyczności doprowadziły do syntezy pochodnej z acetylowaną grupą aminową (N-acetylo-p-aminofenol) zwanej paracetamolem lub acetaminofenem. Zidentyfikowano go już w 1893 roku jako metabolit powszechnie używanej wówczas fenacetyny,

jednak dopiero w 1955 roku trafił na rynek farmaceutyczny. Paracetamol to szeroko stosowany lek przeciwbólowy i przeciwgorączkowy o wciąż nie do końca wyjaśnionym zarówno mechanizmie działania farmakologicznego, jak i mechanizmie toksyczności. Lek ten po przedawkowaniu pozostaje główną przyczyną uszkodzeń wątroby w USA i Wielkiej Brytanii, a mechanizm wywoływanych uszkodzeń mimo trzydziestu lat badań nie jest wciąż w pełni poznany [1,2]. Celem pracy jest podsumowanie obecnego stanu badań dotyczących mechanizmu działania farmakologicznego oraz toksyczności paracetamolu.



Ryc. 1 Biotransformacja paracetamolu w organizmie człowieka

Biotransformacja leku

Paracetamol ($C_8H_9NO_2$) to biały, krystaliczny proszek o masie cząsteczkowej 151,16u i $pK_a = 9,51$. Lek pozostaje stabilny przez 3 lata w formie stałej i przez 2 lata w formie roztworu. Podany doustnie paracetamol jest szybko i prawie całkowicie absorbowany z przewodu pokarmowego na drodze transportu biernego, głównie w obrębie jelita cienkiego. Biodostępność leku waha się od 85% do 98% [3]. Względnie mało leku wiąże się z białkami osocza (od 10 do 25%). Znaczna lipofilność i mała masa cząsteczkowa leku powoduje, że łatwo przechodzi on barierę krew-mózg i osiąga maksymalne stężenie w płynie mózgowo-rdzeniowym pomiędzy 2 a 3 godziną od podania. Główne szlaki metaboliczne paracetamolu obejmują koniugację z aktywnym kwasem glukuronowym (55%) (Ryc. 1, związek A) i aktywnym siarczanem (35%) (Ryc. 1, związek B) oraz utlenianie przez cytochrom P450 (Ryc. 1). Glukuronian paracetamolu jest transportowany do żółci przy udziale białka Mrp2 (ang. multidrug resistance protein 2, białko oporności wielolekowej typu 2) i do krwi za pomocą białka Mrp3 (ang. multidrug resistance protein 3, białko oporności wielolekowej typu 3). Eliminacja siarczanu paracetamolu do żółci przebiega również z udziałem białka Mrp2 i w mniejszym stopniu BCRP (ang. breast cancer resistance protein, transporter nadrodziny ABC związany z opornością wielolekową) [4]. Nie jest zidentyfikowane białko odpowiedzialne za transport tego metabolitu do krwi. Pozostała część leku, która nie ulega reakcji II fazy, jest metabolizowana przez układ cytochromu P450 tworząc aktywny metabolit N-acetylo-p-benzochinonoiminę (NA-

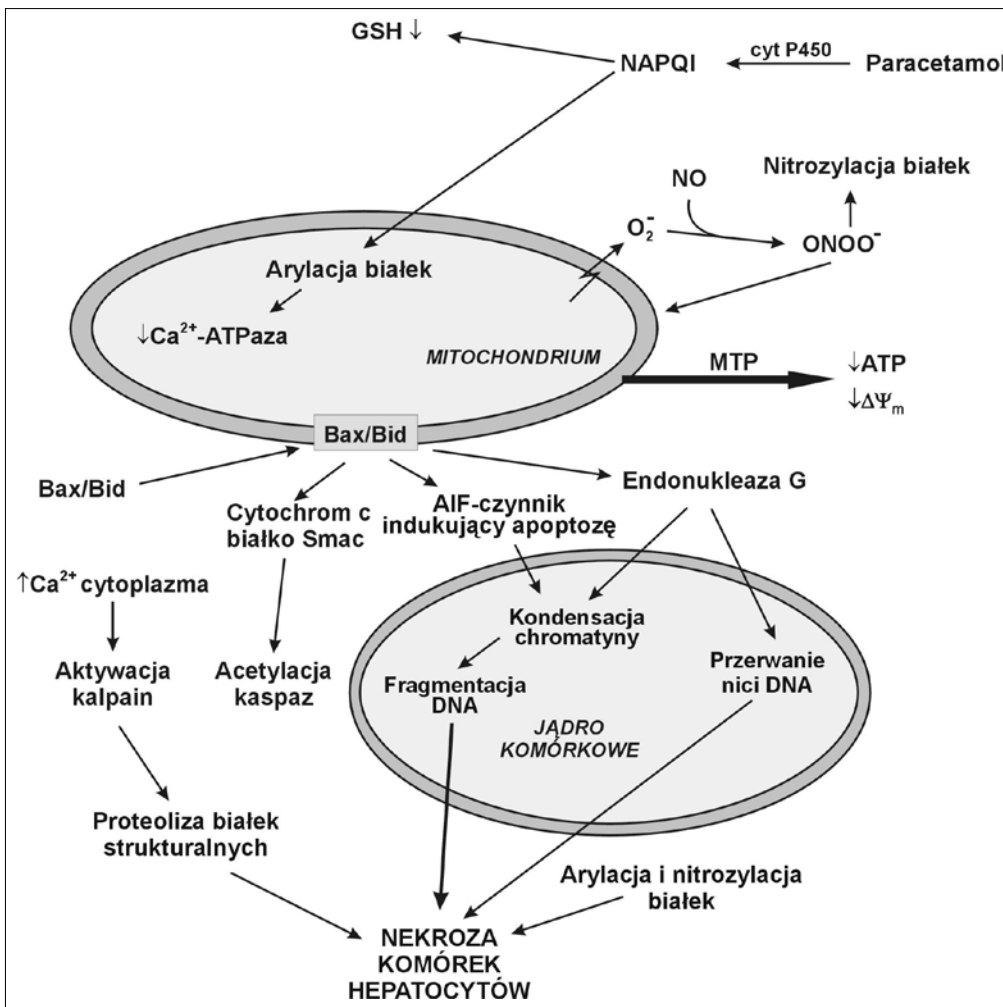
PQI) (Ryc. 1, związek C) [5]. U ludzi w proces ten zaangażowany jest głównie izoenzym CYP2E1 (cytochrom P450 2E1), i w mniejszym stopniu CYP1A2 i CYP3A4 (cytochromy P450 1A2 i 3A4) [6]. NAPQI reaguje z glutationem (GSH) w reakcji nieenzymatycznej lub katalizowanej przez glutationo-S-transferazę, tworząc addukt, który jest transportowany do żółci za pomocą białka Mrp2. Z powstałego koniugatu z glutationem (pełny koniugat) w wyniku dalszych przekształceń biochemicznych tworzą się następnie koniugaty niepełne. Koniugat cysteinowy (3%) ulega acetylowaniu i powstaje kwas merkapturowy (około 3%). Frakcja wolnego, niezmetylizowanego leku wynosi około 4%. Mniejsze znaczenie mają

3-hydroksylacja (3- hydroksyparacetamol) (Ryc. 1, związek D) i tworzenie pochodnej 3-metoksylowej (Ryc. 1, związek E). Powstałe z przebiegu I fazy związki są sprzęgane z glukuronianem lub siarczanem tworząc siarczan lub glukuronian 3-metoksyacetaminofenu i 3-hydroksyacetaminofenu. Dzieci mają mniejszą zdolność do tworzenia glukuronianu niż dorośli, dlatego wśród metabolitów dominują u nich siarczany.

Paracetamol przechodzi barierę krew-łożysko, a po 30 minutach od podania doustnego osiąga stężenie w krążeniu płodowym równe stężeniu we krwi matki. Z uwagi na możliwość przebiegu reakcji z aktywnym siarczanem u płodu lek ten jest uważany za względnie bezpieczny podczas ciąży jak i laktacji. Dziecko przyjmuje nie więcej niż 2% dawki leku spożytego przez matkę, a jego stężenie w mleku kobiet karmiących mieści się w przedziale od 0,1% do 1,85% dawki spożytej przez matkę. Paracetamol ulega dystrybucji względnie równomiernie we wszystkich płynach ustrojowych, jedynie poziom w osoczu może być zmienny. Od 90% do 100% leku jest wydalane z moczem w ciągu 24 godzin od podania [7].

Mechanizm działania farmakologicznego

Mimo długiej obecności na rynku farmaceutycznym, mechanizm działania farmakologicznego paracetamolu jest wciąż niewyjaśniony. Dobra rozpuszczalność tego związku w lipidach, słabe wiązanie się z białkami osocza i łatwość przechodzenia bariery krew-mózg u ludzi i szczurów sug-



Ryc. 2 Mechanizm hepatotoksyczności paracetamolu

ruje możliwość ośrodkowego mechanizmu działania przeciwbólowego i przeciwgorączkowego [7]. Obecnie znane są cztery mechanizmy ośrodkowego działania paracetamolu obejmujące zmiany w układzie serotonergicznym, kanabinoidowym, opioidowym i zmiany aktywności cyklooksygenazy.

Mechanizm ośrodkowego działania paracetamolu oparty o zmiany wywoływane w układzie serotonergicznym potwierdziło wiele faktów doświadczalnych. Lek ten stymuluje aktywność zstępujących szlaków serotonergiczných, co hamuje transmisję sygnałów nocycyptywnych do rdzenia kręgowego [8]. Mechanizmy te obejmują hamowanie syntezy NO, niebezpośrednie oddziaływanie z receptorami serotonergicznymi (5-HT_{2A} i 5-HT₃) i osłabienie uwalniania PGE₂ (ang. prostaglandin E₂, prostaglandyna E₂) na poziomie rdzenia kręgowego [9,10]. Paracetamol obniża liczbę receptorów 5-HT₂ w mózgu szczurów o 30% po siedmiu dniach terapii [11]. Hipotezę serotonergicznego mechanizmu działania leku potwierdza ponadto fakt, iż jeden z antagonistów receptora 5-HT₃ (Tropisetron) znosi działanie antynocycyptywne paracetamolu podawanego dożylnie. Efektu inhibicji działania paracetamolu nie wykazano jednak dla innych antagonistów receptorów 5-HT₃ (Ondansetron, Granisetron), co wskazuje na możliwość oddziaływania tego leku z innym, nieznanym do chwili obecnej podtypem

receptora 5-HT₃ [12]. Choć wpływ paracetamolu na aktywność ośrodkowych szlaków serotonergiczných nie budzi wątpliwości, mechanizm ten wymaga jeszcze dalszych szczegółowych badań na poziomie molekularnym.

Badanie wpływu paracetamolu na aktywność cyklooksygenazy jest przedmiotem wieloletnich badań naukowych. Paracetamol jest lekiem przeciwbólowym i przeciwgorączkowym o bardzo słabym, trudnym do oceny klinicznej działaniu przeciwzapalnym. Lek podany doustnie zmniejsza ilość metabolitów prostaglandyn w moczu, ale nie wpływa na zahamowanie ich syntezy w płytkach krwi czy błonie śluzowej żołądka. W 1972 roku Flower i Vane wykazał, że paracetamol hamuje syntezę prostaglandyn w mózgu, czego jednak nie potwierdziły późniejsze badania, prowa-

dzące do sprzecznych wyników. Ponieważ lek zastosowany w wysokich dawkach w warunkach testów *in vitro* słabo hamował aktywność COX-1 i COX-2 (ang. cyclooxygenase-1, izoenzym 1 cyklooksygenazy) a w niskich dawkach stymulował aktywność tych enzymów, dlatego zaproponowano istnienie trzeciej izoformy cyklooksygenazy COX-3, stanowiącej punkt uchwytu dla paracetamolu [13]. COX-3 będący produktem alternatywnego składania transkryptu izoformy COX-1 zawiera fragment intronu genu cyklooksygenazy i w warunkach testów *in vitro* na zwierzętach był silnie hamowany przez paracetamol [14]. Włączenie 94 nukleotydów pierwszego intronu zmienia ramkę odczytu i prowadzi do przedwczesnej terminacji translacji kodowanego polipeptydu. Wprowadzona nazwa COX-3 nie jest właściwa, gdyż sugeruje, że jest to odrębny gen cyklooksygezy, tworzący odrębną sekwencję białkową (izoenzym). Bardziej wskazana jest nazwa COX-1b, gdyż forma COX-3 jest produktem tego samego genu co COX-1. Brak homologii sekwencji aminokwasowej COX-3 do innych znanych białek, jak również do samych COX-1 i COX-2 powoduje, że część autorów sugeruje, iż białko to nie pełni funkcji związanych z biosyntezą prostaglandyn. Ponadto zwraca się uwagę na zdolność hamowania aktywności COX-3 przez bardzo wysokie dawki paracetamolu (w warunkach testów *in vitro* lub testów na zwierzętach), trudne do osiągnięcia w warunkach

klinicznych po zastosowaniu standardowych dawek leku [15].

Paracetamol jest zdolny także do oddziaływania z receptorami opioidowymi. Pini i wsp. [16] zauważyli, że nalokson może znosić działanie antynocycyptywne paracetamolu w warunkach testu *in vitro*. Dalsze badania wykazały, że paracetamol obniża stężenie dynorfiny syntetyzowanej bezpośrednio po rozpoczęciu stanu zapalnego, a blokada receptorów opioidowych κ znosi działanie przeciwbólowe paracetamolu. Równoczesne podanie szczurom małej, subprogowej dawki paracetamolu (100mg/kg m.c) i morfiny (3mg/kg/m.c) powoduje taki sam efekt obniżający ilość dynorfiny w korze mózgowej jak podanie wysokiej dawki samego paracetamolu [17]. Obserwacje te stały się przesłankami do wprowadzenia na rynek preparatów złożonych zawierających paracetamol i słabe leki opioidowe, szczególnie tramadol. Połączenie tych leków wykazuje synergizm działania farmakologicznego, przy czym paracetamol odpowiada za szybki, początkowy efekt przeciwbólowy, a tramadol za przedłużenie tego działania w czasie. Połączenie to jest dobrze tolerowane, skuteczne zarówno w leczeniu ostrych bólów pooperacyjnych jak i bólu przewlekłego, jak również nie powoduje rozwoju tolerancji po okresie dwuletniej terapii. Połączenie paracetamolu i tramadolu rzadziej dawało senność i zaparcia w porównaniu z połączeniem paracetamolu i kodeiny [18].

Hogestatt i wsp. [19] zaproponowali zupełnie odmienny mechanizm działania paracetamolu w oparciu o receptory kanabinoidowe CB1. Autorzy ci wykazali, że paracetamol może podlegać deacetylacji z wytworzeniem p-aminofenolu (Ryc. 1 związek F), który sprzęga się z kwasem arachidonowym tworząc produkt o nazwie AM404 (Ryc. 1, związek G). Związek ten wykryto w mózgu szczurów po podaniu paracetamolu, a w reakcję jego syntezy zaangażowana jest hydrolaza amidów kwasów tłuszczowych (ang. *fatty acid amide hydrolase*, FAAH), uczestnicząca zarówno w hydrolizie, jak i syntezie amidów kwasów karboksylowych. Enzym ten uczestniczy w syntezie jednego z naturalnych agonistów receptorów CB1- anandamidu, a jego brak u transgenicznych myszy uniemożliwiał syntezę adduktu AM404. AM404 jest agonistą receptorów kanabinoidowych CB1, co w połączeniu z aktywnością metabolitów powstających pod wpływem cyklooksygenazy reguluje aktywność szlaków czucia bólu i ma wpływ na termoregulację. Hipotezę tą potwierdza fakt zniesienia efektu przeciwbólowego paracetamolu przez antagonistów receptorów CB1. Jednocześnie autorzy wyjaśnili wątpliwości dotyczące wpływu paracetamolu na syntezę prostaglandyn w warunkach niektórych testów *in vitro*. AM404 hamuje syntezę prostaglandyny PGE2 indukowaną przez lipopolisacharydy, a także hamuje syntezę COX-1 i COX-2 w obrębie makrofagów, co tłumaczy rozbieżności w wynikach uzyskanych badań [20].

Mechanizm toksyczności

Wczesnym efektem biotransformacji po przedawkowaniu paracetamolu jest wyczerpanie rezerw glutationu w wątrobie obejmujące zarówno kompartment cytoplazmatyczny jak i mitochondrialny (Ryc. 2). Wytworzony NAPQI wobec braku GSH wchodzi w reakcję z licznymi białkami

wewnątrzkomórkowymi prowadząc do ich modyfikacji kowalencyjnej - arylicacji. Tworzenie połączeń kowalencyjnych z białkami uważano przez wiele lat za główny mechanizm hepatotoksyczności paracetamolu [21], jednak niedawne wyniki badań wydają się zaprzeczać tej hipotezie. Aktywność większości enzymów podlegających modyfikacji kowalencyjnej jest jedynie w niewielkim stopniu obniżona, z wyjątkiem syntetazy glutaminowej i syntetazy karbamilo-fosforanowej, których aktywność spada o więcej niż 50% [22]. Stwierdzono, że izomeryczny w stosunku do paracetamolu 3-hydroksyacetanilid powoduje wyczerpanie rezerw GSH i modyfikację kowalencyjną wielu białek, lecz nie daje jednak efektu hepatotoksycznego. Obecnie większość badaczy skłania się do tezy uznającej wyczerpanie rezerw GSH i modyfikację kowalencyjną białek mitochondrialnych przez NAPQI za pierwszy etap kaskady procesów molekularnych inicjujących uszkodzenie wątroby. Etap ten jednak musi ulec potencjalizacji poprzez kolejne procesy patologiczne w obrębie hepatocytów [23].

Modyfikacja kowalencyjna białek mitochondrium po przedawkowaniu paracetamolu zaburza pracę łańcucha oddechowego. NAPQI wywołuje w hepatocytach stres oksydacyjny, czego efektem jest wysoka kumulacja disiarczku glutationu GSSG będącego markerem tworzenia się reaktywnych form tlenu wewnątrz komórki. Mitochondria izolowane od zwierząt leczonych paracetamolem wykazują skrajnie wysokie stężenie GSSG równe niemalże całej komórkowej puli tego leku. Wykazano, że ani nadtlenuk wodoru ani rodniki hydroksylowe nie są głównymi sprawcami uszkodzeń wątroby. Potwierdza to zarówno brak peroksydacji lipidów u zwierząt leczonych dużymi dawkami paracetamolu, jak również brak efektu hepatoprotekcyjnego suplementacji dużymi dawkami witaminy E tych zwierząt [24]. Zasadniczą rolę mediatora w uszkodzeniach hepatocytów przypisuje się nadtlenoazotynowi (ONOO⁻) powstającemu pod wpływem iNOS (ang. *inducible nitric oxide synthase*, indukowalna synteza tlenku azotu) [25]. Synteza tego związku oraz wywoływany stres oksydacyjny hamuje ATPazę wapniową-magnezową, co prowadzi do akumulacji jonów Ca²⁺ wewnątrz mitochondrium i wzrostu przepuszczalności wewnętrznej błony tego organellum. Tworzą się wówczas pory MPT (ang. *mitochondrial permeability transition pore*) pozwalające na transport związków o masie cząsteczkowej do 1500 u, następuje spadek potencjału membranowego $\Delta\Psi_m$, upośledzenie produkcji ATP i uwolnienie cytochromu c zapoczątkowującego apoptozę komórek [26]. Wzrost stężenia jonów Ca²⁺ w cytoplazmie prowadzi także do aktywacji proteaz kalpain, które trawią białka strukturalne komórki i nasilają zmiany nekrotyczne [27].

Przedawkowanie paracetamolu powoduje fragmentację DNA i kariolizę będące wynikiem aktywacji Ca²⁺-zależnej endonukleazy (Ryc. 2). Uwalnianie cytochromu c z wnętrza mitochondrium prowadzi do aktywacji kaspazy 3 rozpoczynającej kaskadę wydarzeń związanych z apoptozą [28]. Proapoptotyczne białko Bax przemieszcza się z cytozolu do mitochondrium wywołując tworzenie por w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Działanie to wspomagają także inne białka proapoptotyczne Bad i skrócona forma białka Bid. Tworzenie por w błonie zewnętrznej mitochondrium w połączeniu z istniejącymi wcześniej porami w błonie

wewnętrznej inicjowanymi przez nadtlenoazotyn prowadzi do uwalniania białek z przestrzeni transmembranowej tego organellum. [29]. Uwolniony czynnik indukujący apoptozę (ang. *apoptosis inducing factor*, AIF) i endonukleaza G powodują kondensację chromatyny i fragmentację DNA, a cytochrom c i białko Smac (ang. *mitochondria derived activator of caspases*, białko mitochondrialne aktywujące kaspazy) aktywują kaskadę kaspaz, która jest jednak powstrzymana przez deficyt ATP. Masywne uszkodzenia DNA jądra komórkowego i liczne fragmentacje błon mitochondrialnych w połączeniu z nasiloną aktywacją proteaz (kalpajny) prowadzą do przzerwania ciągłości błon komórkowych i nekrozy hepatocytów.

Mimo licznych prac i wielu lat badań istnieje sporo pytań dotyczących hepatotoksyczności paracetamolu. Nadal istnieje spór o udział apoptozy i nekrozy w zmianach wywoływanych przez paracetamol. Pierwsze prace sugerowały, że po przedawkowaniu paracetamolu około 40% hepatocytów umiera w wyniku apoptozy [30]. Szczegółowe badania morfologiczne wskazywały, że główną przyczyną śmierci hepatocytów (ponad 95%) jest nekroza. Wynikom tym wydaje się zaprzeczać olbrzymia ilość faktów doświadczalnych świadczących o toczącym się procesie apoptozy (translokacja białek Bax i Bid do mitochondrium, uwolnienie cytochromu c, fragmentacja DNA pomiędzy nukleosomami) [31]. Wciąż trwają poszukiwania skutecznego leku zapobiegającego uszkodzeniom wątroby, a stosowana od wielu lat acetylocysteina jest nadal jedynym skutecznym antidotum w zatruciach preparatami paracetamolu. Wyjaśnienia wymaga wpływ aktywności cytochromu P450, enzymów biorących udział w drugiej fazie biotransformacji oraz stężeń GSH i innych antyoksydantów na stopień zmian wywołanych przez paracetamol i indywidualną wrażliwość na jego efekt toksyczny.

Nadzieję na odkrycie wielu tajemnic związanych z toksycznością paracetamolu przynoszą badania genomowe i rozwój proteomiki. U zwierząt, którym podawano paracetamol w dawce 300mg/kg m.c wykazano zmianę aktywności transkrypcyjnej ponad 300 genów kodujących białka cyklu komórkowego, czynniki wzrostu, cząsteczki adhezyjne, mediatory zapalenia oraz białka biorące udział w sygnalizacji wewnątrzkomórkowej [32]. Stosując u badanych zwierząt dawkę leczniczą i toksyczną paracetamolu wykazano znaczące różnice w ekspresji białek mitochondrialnych, co pozwala wysnuć przypuszczenie, że odgrywają one kluczową rolę w rozwoju toksyczności [33]. Wyniki te potwierdziły także badania porównujące ekspresję białek u dwóch szczepów myszy o różnej wrażliwości na paracetamol. Szczep myszy o większej wrażliwości wykazywał silniejszy stopień zahamowania ekspresji białek mitochondrialnych w stosunku do szczepu bardziej opornego, u którego wystąpiła wyższa ekspresja enzymów antyoksydacyjnych i białek odpowiedzi na stres oksydacyjny [34]. Pozostaje nam głęboko wierzyć, że wiek XXI odkryje wszystkie tajemnice związane zarówno z mechanizmem działania jak i toksycznością tego prostego aminofenolu, którego olbrzymie spożycie przez populację europejską i amerykańską jest zupełnie nieadekwatne do wiedzy o nim.

Literatura:

1. Lee C i wsp. A comparison of the efficacy and safety of nonsteroidal antiinflammatory agents versus acetaminophen in the treatment of osteoarthritis: a meta-analysis. *Arthritis Rheum* 2004; 51: 746-54.
2. Jaeschke H, Bajt L. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci* 2006; 89: 31-41.
3. McGilveray I, Mattock G, Fooks J. Acetaminophen: a comparison of the physiological availabilities of different commercial dosage forms. *Can J Pharmaceut Sci* 1971; 6: 38-42.
4. Zamek-Gliszczyński M i wsp. Multiple mechanisms are involved in the biliary excretion of acetaminophen sulfate in the rat: role of Mrp2 and Bcrp1. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 1158-65.
5. Nelson S. Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 267-78.
6. Gonzalez F. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res* 2005; 569: 101-110.
7. Smith H. *Drugs for pain*. Hanley & Belfus 2003, Philadelphia: 34-38.
8. Bonnefont J i wsp. Orally administered paracetamol does not act locally in the rat formalin test: evidence for a supraspinal, serotonin-dependent antinociceptive mechanism. *Anesthesiology* 2003; 99: 976-81.
9. Pelissier T i wsp. Paracetamol exerts a spinal antinociceptive effect involving an indirect interaction with 5-hydroxytryptamine₃ receptors: *in vivo* and *in vitro* evidence. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278: 8-14.
10. Srikiatkachorn A, Tarasub N, Govitrapong P. Acetaminophen-induced antinociception via central 5-HT_{2A} receptors. *Neurochem Int* 1999; 34: 491-98.
11. Sandrini M i wsp. Effect of acute and repeated administration of paracetamol on opioidergic and serotonergic systems in rats. *Inflamm Res* 2007; 56: 139-42.
12. Libert F i wsp. Acetaminophen: a central analgesic drug that involves a spinal tropisetron-sensitive, non-5-HT₃ receptor-mediated effect. *Mol Pharmacol* 2004; 66: 728-34.
13. Botting R, Ayoub S. COX-3 and the mechanism of action paracetamol/acetaminophen. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 72: 85-87.
14. Chandrasekharan N i wsp. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 13926-31.
15. Snipes J i wsp. Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative cyclooxygenase-3) in rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 313: 668-76.
16. Pini L i wsp. Naloxone-reversible antinociception by paracetamol in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 934-40.
17. Sandrini M i wsp. The effect of a paracetamol and morphine combination on dynorphin A levels in the rat brain. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 1409-16.

18. Schug S. Combination analgesia in 2005 - a rational approach: focus on paracetamol-tramadol. *Clin Rheumatol* 2006; 25: 16-21.
19. Hogestatt E i wsp. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem* 2005; 280: 31405-12.
20. Ottani A i wsp. The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 2006; 531: 280-1.
21. Mitchell J i wsp. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. Role of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 1973; 187:185-194.
22. Gupta S i wsp. Inhibition of carbamyl phosphate synthetase-I and glutamine synthetase by hepatotoxic doses of acetaminophen in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 146: 317-327.
23. Jaeschke H, Knight R, Bajt L. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 2003; 144: 279-288.
24. Knight T i wsp. Role of lipid peroxidation as a mechanism of liver injury after acetaminophen overdose in mice. *Toxicol Sci* 2003;76: 229-236.
25. Cover C i wsp. Pathophysiological role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation during acetaminophen-induced liver cell necrosis in mice. *Toxicol Sci* 2005; 84: 201-208.
26. Kim S, He L, Lemasters J. Mitochondrial permeability transition: A common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 463-470.
27. Liu X, Van Vleet T, Schnellmann R. The role of calpain in oncotic cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 44: 349-370.
28. Hill M, Adrain C, Martin S. Portrait of a killer: The mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv* 2003; 3: 19-26.
29. Jaeschke H, Lemasters J. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2003; 125: 1246-1257.
30. Ray S i wsp. Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemisuccinate pretreatment. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279: 1470-1483.
31. Gujral J i wsp. NADPH oxidase-derived oxidant stress is critical for neutrophil cytotoxicity during endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: 243-252.
32. Reilly T i wsp. Expression profiling of acetaminophen liver toxicity in mice using microarray technology. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 321-328.
33. Ruepp S i wsp. Genomics and proteomics analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver. *Toxicol Sci* 2002; 65: 135-150.
34. Welch K i wsp. Proteomic identification of potential susceptibility factors in drug-induced liver disease. *Chem Res Toxicol* 2005; 18: 924-933.

Adres do korespondencji:

Sławomir Smolik

Katedra i Zakład Biochemii 41-200 Sosnowiec ul. Narcyzów 1

e-mail : epimer@wp.pl

tel. 32 3641003, 665345588

ROZDZIAŁ BIAŁEK ŻÓŁTKA JAJA KURZEGO*

SEPARATING CHICKEN EGG WHITES AND EGG YOLKS

Florian Ryszka¹, Barbara Dolińska¹, Lucyna Leszczyńska¹, Tadeusz Trziszka²

¹Farmaceutyczny Zakład Naukowo-Produkcyjny „Biochefa”, Sosnowiec

Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Florian Ryszka

²Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

Kierownik: Prof. dr hab. n. wet. Tadeusz Trziszka

Streszczenie

Fracjonowanie żółtek jaj kurzych przeprowadzono zmodyfikowaną metodą Losso i Nakai otrzymując surowe frakcje białkowe: fosfowitynę i liwetynę. Określono wybrane właściwości fizykochemiczne otrzymanych frakcji białkowych. Fosfowitynę otrzymano z wydajnością 96%, a liwetynę z wydajnością 85,1%. Otrzymane frakcje białkowe żółtka będą stanowiły półprodukty do dalszego ich oczyszczania. Zastosowana metoda do izolacji wybranych substancji białkowych żółtka jaja kurzego odznacza się dość wysoką wydajnością i prostotą.

Słowa kluczowe: rozdział, żółtka jaja, białka, fosfowityna (foswityna), liwetyna

Abstract

The fractionation of chicken egg yolks was carried out using a modified version of the Losso and Nakai method, resulting in the obtainment of the following raw protein fractions: phosvitine and livetine. Selected physicochemical properties of the obtained protein fractions were defined. Phosvitine was obtained with an efficiency of 96%, while livetine was obtained with an efficiency of 85,1%. The obtained protein fractions will constitute half-products for further refinement. The applied method of isolating selected protein substances of chicken egg yolks is marked by a relatively high degree of efficiency and simplicity.

Key words: separating, chicken egg yolks, protein, phosvitine, livetine

Wstęp

Znaczenie jaj jako surowca stosowanego w medycynie wzrasta ze względu na perspektywę opracowania metod otrzymywania kur transgenicznych, które mogą być wykorzystane do produkcji białek stosowanych w leczeniu wielu chorób ludzi i zwierząt [1,2].

Jajo kurze zawiera białka strukturalne, wiążące oraz transportujące witaminy i mikroelementy, enzymy proteolityczne, inhibitory proteaz oraz immunoglobuliny [1-3]. Jest bardzo bogatym źródłem pełnowartościowego białka i cennych składników odżywczych - witamin: A, D, E, B₂, B₁₂, kwasu foliowego, biotyny oraz składników mineralnych: sodu, potasu, wapnia, magnezu, fosforu, chloru, siarki, cynku, żelaza, miedzi, manganu, jodu, seleniu. Białko jaja ze względu na pełnowartościowy skład aminokwasowy zostało uznane przez organizację FAO/WHO za międzynarodowy wzorzec. Substancje białkowe zawarte w jaju stanowią 10% masy białka oraz 16,6% - masy żółtka. Do substancji białkowych żółtka należy: fosfowityna, liwetyna i lipoproteidy [1-3].

Fosfowityna (foswityna) stanowi ~ 7% suchej masy żółtka. Jest białkiem bogatym w fosfor. 50% reszt aminokwa-

sowych fosfowityny stanowią reszty fosfoseryny. Stwierdzono, że tworzy ona rozpuszczalne kompleksy z wapniem i magnezem. Zwiększa się w ten sposób przyswajalność wapnia i magnezu przez organizm [4,5]. Białko to wiąże prawie całe żelazo z żółtka. Kompleks fosfowityny z żelazem jest bardzo trwały i utrzymuje się nawet podczas ogrzewania żółtka [6]. Fosfowityna posiada właściwości antykoagulacyjne i antyoksydacyjne [1,2,7,8]. Ze względu na te właściwości jest stosowana do hamowania procesów oksydacji w margarynach i maśle. Jest świetną alternatywą dla chemicznych (nierzadko toksycznych) antyoksydantów.

Liwetyna stanowi 5% suchej masy żółtka [1,2]. Jest alergenem obecnym w żółtku jaj oraz w surowicy krwi kurcząt. Została ona zidentyfikowana jako czynnik często alergizujący dzieci i osoby dorosłe [9,10]. Ważnym alergenem żółtka jest α -liwetyna, odpowiedzialna za odczyny krzyżowe, prawdopodobnie z albuminami [9,11]. Oczyszczone alergeny białka jaj używa się obecnie do prób punktowych w stężeniu 10 mg/ml [10,12]. Rozcieńczona plazma zawierająca frakcję liwetyn i LDL lipoprotein wykorzystywana jest do otrzymywania preparatu immunoglobuliny żółtka [1].

Celem niniejszych badań było rozdzielenie składników żółtka jaja kurzego i określenie wybranych właściwości fi-

* Praca naukowa finansowana ze środków na realizację projektu rozwojowego „Chemiczna ekstrakcja frakcji proteinowo-fosfolipidowych żółtka jaja, ich enzymatyczna modyfikacja ukierunkowana na wykorzystanie biomedyczne oraz produkcję suplementów diety” (nr R 05 021 03) w latach: 2007-2010.

zykochemicznych otrzymanych frakcji białkowych: surowej fosfowityny i liwetyny. Otrzymane frakcje białkowe żółtka będą stanowiły półprodukty do dalszego ich oczyszczenia.

Materiały i metody

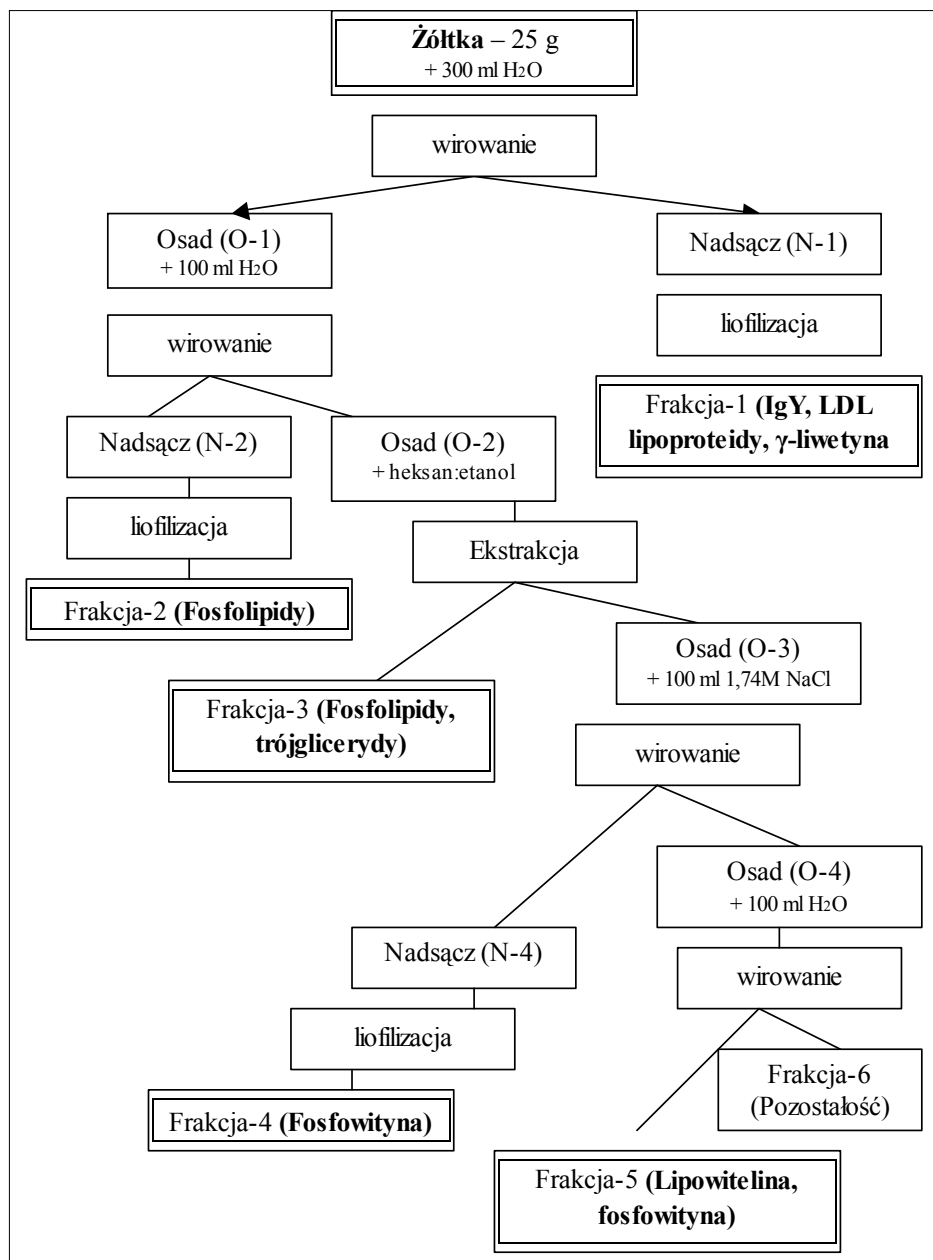
Żółtka jaj kurzych suszone rozpyłowo – zawartość wilgoci: 4,2%; rozpuszczalność: 98,1%; nr serii: 22.09.07, 278; pochodzenie: Zakłady Jajczarskie Owopol, Nowa Sól.

Rozdział składników żółtka jaj kurzych

Rozdział przeprowadzono zmodyfikowaną metodą Losso i Nakai [1,13].

Do badań użyto 25 g żółtek suszonych rozpyłowo. Żółtka zalewano 300 ml zimniej wody i mieszano na mieszadle magnetycznym w ciągu 5 minut. Uzyskaną jednorodną mieszaninę o wartości pH = 6,49, doprowadzano do wartości pH = 5,25 za pomocą 10% r-ru HCl mieszając na mieszadle magnetycznym przez 1 h w temp. 6°C. Mieszaninę następnie wirowano (3000 obr./min.; 30 min.) i oddzielano osad od nadsącza. Otrzymany nadsącz (N-1) zawierający γ -liwetynę, IgY (immunoglobuliny) oraz LDL lipoproteiny liofilizowano (Frakcja-1). Część nierozpuszczalną (O-1) zalewano 100 ml wody i mieszano na mieszadle magnetycznym przez 1 h w temp. 6°C. Zawiesinę wirowano (3000 obr./min.; 30 min.), oddzielano osad (O-2) od nadsącza (N-2). Nadsącz (N-2) zawierający fosfolipidy liofilizowano (Frakcja-2). Osad (O-2) ekstrahowano 250 ml mieszaniny heksan – etanol (3:1) w ciągu 3 h w temp. 6°C. Warstwa heksanowa (N-3) zawiera fosfolipidy i trójglicerydy (Frakcja-3). Część nierozpuszczalną (O-3) zalewano natomiast 100 ml 1,74 M r-ru NaCl i ekstrahowano mieszając na mieszadle magnetycznym przez 6 h w temp. 6°C. Całość wirowano (3000 obr./min.; 30 min.), oddzielano osad (O-4) od nadsącza (N-4). Nadsącz (N-4) zawierający fosfowitynę liofilizowano (Frakcja-4). Osad (O-4) zalewano 100 ml wody i pozostawiano w lodówce przez 24 h. Otrzymaną zawiesinę wirowano (3000 obr./min.; 30 min.) i oddzielano osad (O-5) od nadsącza (N-5). Nadsącz (N-5) zawierający lipowitelinę i fosfowitynę liofilizowano (Frakcja-5). Osad (O-5) odrzucono.

Eksperyment powtórzono 5-krotnie.



Ryc. 1. Schemat rozdziału składników żółtka jaj kurzych zmodyfikowaną metodą Losso i Nakai [13]

Określenie wybranych właściwości fizykochemicznych

Na poszczególnych etapach rozdziału składników żółtka określano następujące właściwości otrzymanych frakcji białkowych [14]:

Zawartość białka – Mierzono absorbancję 0,04% roztworu białka przy długości fali $\lambda=278$ nm. Wartości absorbancji mieściły się w granicach 0,2-0,6. Pomiarów dokonywano w kuwetach kwarcowych o grubości 1 cm przy użyciu spektrofotometru UV-VIS „CE 3021” („Cecil”, Anglia). Dokładność fotometryczna spektrofotometru wynosiła $= \pm 0,005$ A;

Współczynnik optyczny (K) - Mierzono absorbancję 0,04% roztworu białka przy długości fali $\lambda=278$ nm oraz $\lambda=250$ nm. Określano stosunek absorbancji przy długości fali $\lambda=278$ nm do absorbancji przy $\lambda=250$ nm; **Masę cząsteczkową** – Wyznaczano metodą elektroforezy dyskowej w 10% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturują-

cych [15]. Stosowano 10% żel preparatywny, pH=8,8; 4,4% żel zagęszczający, pH=6,8; bufor elektrodowy, pH=7,3. Nanoszono 20 µg białka (20 µl próbki). Rozdziału dokonano przy natężeniu 20 mA dla żelu zagęszczającego i 30 mA dla preparatywnego. Po wybarwieniu i utrwaleniu żelu mierzono odległość pasma od startu i wyznaczano wartość Rf dla każdego pasma. Rf – stosunek odległości każdego pasma od szczytu żelu do odległości przebytej przez wskaźnik. Zastosowano wzorzec mas (Molecular weight markers, m.w. range – 12.300 – 78.000) i wyznaczono równanie prostej regresji: $y = -1,0027 \times Rf + 5,2384$, współczynnik korelacji (R^2) = 0,9889. Przedstawione równanie opisuje istniejącą zależność pomiędzy masą cząsteczkową wzorca, a wartością Rf. Po zakończonej elektroforezie wykonywano analizę densytometryczną (przystawka densytometryczna, Medson, Polska) [15].

Wyniki i ich omówienie

Poza technologicznym wykorzystaniem przetworów z jaj w przemyśle spożywczym, coraz częściej i szerzej rozwija się nowe kierunki ich zastosowania w przemyśle: farmaceutycznym, kosmetycznym, chemicznym i paszowym [1,8]. Jednak izolacja poszczególnych składników żółtka jaja kurzego jest utrudniona ze względu na jego skład chemiczny, a w szczególności dużą ilość lipidów - triacyloglicerydów i fosfolipidów. Lipidy stanowią ~2/3 suchej masy substancji. 1/3 suchej masy stanowią natomiast białka, z których około 80% to lipoproteidy [1,13,16]. Do badań użyliśmy żółtek jaj kurzych suszonych rozpyłowo. Z doniesień literaturowych wynika, że jako tzw. „żółtka funkcjonalne” przewyższają one właściwościami żółtka suche [1].

Według zmodyfikowanej metody Losso i Nakai, fosfowityna ekstrahowana jest 1,74M r-rem NaCl z suchego osadu białek po poprzedniej ekstrakcji lipidów z granul. Rozdział grawimetryczny (wirowanie lub sedymentacja) frakcji lipowitelinowej zastąpiono filtracją przez bibułę, a następnie przez membranę o wielkości porów 0,45 µm [13]. Ta metoda filtracji nie jest jednak wykorzystywana w warunkach przemysłowych, ze względu na polaryzację membran przez lipoproteidy.

Rozdział żółtek przeprowadziliśmy zmodyfikowaną metodą Losso i Nakai w celu uzyskania surowych frakcji białkowych: fosfowityny i liwetyny. Schemat rozdziału składników żółtek jaj kurzych przedstawiono na rys. 1.

Rozdzielając składniki żółtka jaj kurzych według przedstawionego schematu otrzymaliśmy 6 surowych frakcji. Frakcję-1 zawierającą γ-liwetynę, IgY oraz lipoproteidy. Frakcja-2 zawiera fosfolipidy; a frakcja-3 – fosfolipidy

Frakcja	Skład	Masa [g]	Wydajność [%]	E(278 nm)	K278/250
1.	γ-liwetyna, IgY, LDL lipoproteidy	2,10 ± 0,23	85,1	0,71 j.o.	1,82
2.	Fosfolipidy	0,30 ± 0,11	10,0	n.o.	n.o.
3.	Fosfolipidy, trójglicerydy	7,17 ± 0,91	79,8	n.o.	n.o.
4.	Fosfowityna	1,01	96,0	0,61 j.o.	0,89
5.	Lipowitelina, fosfowityna	88,1 mg	7,84	0,87 j.o.	1,26

n.o. – nie oznaczano

Tabela I. Wybrane właściwości frakcji białkowych żółtka – fosfowityny i liwetyny

Frakcja	Nr piksu	Pole pod krzywą		Całkowite pole pod krzywą [mm ²]	Rf	m.cz. [kDa]
		[mm ²]	[%]			
1.	1	0,16628	7,55	2,20165	0,803	21,50
	2	1,23956	56,30		0,677	36,01
	3	0,76694	34,83		0,393	78,20
4.	1	2,00693	64,17	3,12752	0,677	36,27
	2	1,12059	31,54		0,452	60,97

Tabela II. Parametry densytogramów otrzymanych frakcji białkowych: fosfowityny i liwetyny

i trójglicerydy. Frakcja-4 zawiera fosfowitynę, a frakcja-5 – lipowitelinę i fosfowitynę. Frakcja-6 stanowi pozostałość, którą odrzucano.

Otrzymaliśmy frakcje o masie od 88,1 mg do 7,17 g. Biorąc pod uwagę bilans masowy, wydajności otrzymanych frakcji były różnicowane. Z największą wydajnością – 96,0% otrzymano frakcję-4 zawierającą fosfowitynę. Fosfowityna znajduje się również we frakcji-5, która zawiera także lipowitelinę. Stosunek molowy fosfowityny do lipowiteliny w tej frakcji wynosi 2:1, co odpowiada stosunkowi wagowemu 0,23:1 [1]. Z dość dużą wydajnością – 85,1% otrzymaliśmy także frakcję-1 zawierającą między innymi liwetynę. 5,02 g otrzymaliśmy frakcji-6, którą odrzucano.

Wybrane właściwości frakcji białkowych żółtka – fosfowityny i liwetyny zestawiliśmy w tabeli I.

Analiza spektrofotometryczna otrzymanej fosfowityny wykazała, że 1 mg otrzymanego białka wykazuje ekstynkcję 0,61 j.o., a wzorzec – 0,48 j.o. Wskazuje to, że otrzymane białko jest jeszcze częściowo zanieczyszczone.

Zawartość fosfowityny i liwetyny w otrzymanych frakcjach identyfikowaliśmy metodą elektroforezy na żelu PAA w warunkach denaturujących [15]. Parametry densytogramów wybranych frakcji białkowych zestawiono w tabeli II.

Wiadomo jest, że fosfowityna składa się z dwóch frakcji o masie cząsteczkowej 160 i 190 kDa. Frakcje te mogą jednak dysocjować na mniejsze fragmenty o masach cząsteczkowych od 37 do 45 kDa [1].

Analiza otrzymanego żelu wykazała na ścieżce naniesionego osadu surowej fosfowityny (Frakcja-4) 2 główne prążki o masach 36,27 kDa i 60,97 kDa. Białko o masie 36,27 kDa odpowiada masie cząsteczkowej fosfowityny. Obecność drugiego prążka może natomiast świadczyć o obecności zagregowanej cząsteczki fosfowityny.

Liwetyna jest natomiast białkiem bardzo złożonym i nie dokładnie poznanym. Rozdzielono ją na 3 frakcje α, β i γ, w proporcjach 2:5:3, odpowiednio o masie cząsteczkowej 80, 45 i 150 kDa. Z doniesień literaturowych wynika, że metodą elektroforezy na żelu PAA rozdzielono ją aż na 15 frakcji [1].

Analiza densytogramu otrzymanej frakcji surowej liwetyny (Frakcja-1) wykazała nam obecność 3 prążków o ma-

się cząsteczkowej – 78,2 kDa, 36 kDa i 21,5 kDa. Prążek o masie cząsteczkowej 78 kDa to najprawdopodobniej frakcja α -liwetyny. Masa cząsteczkowa α -liwetyny wynosi bowiem 80 kDa. Znaczna ilość otrzymanej frakcji liwetyny – 2,10 g i fakt, że jeden z prążków wykazuje masę odpowiadającą fosfowitynie, można wskazywać, że znajduje się w niej nie oddzielona fosfowityna.

Możliwości izolowania z jaj frakcji o wysokiej aktywności biologicznej, takich jak: lizozym, cystatyna, immunoglobuliny, fosfowityna czy lecytyna stwarza ogromne możliwości zastosowania ich, szczególnie w profilaktyce i leczeniu [1]. Pozostałość po rozfrakcjonowaniu może natomiast stanowić doskonały produkt paszowy.

Wniosek

Metoda zastosowana przez nas do izolacji wybranych substancji białkowych żółtka jaja kurzego odznacza się dość wysoką wydajnością i prostotą. Otrzymanie surowych frakcji białkowych daje możliwość opracowania metod dalszego ich oczyszczania.

Piśmiennictwo

1. Trziszka T. Jajczarstwo. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Wrocław 2000.
2. Gołąb K, Warwas M. Białka jaja kurzego – właściwości biochemiczne i zastosowania. *Adv Clin Exp Med* 2005; 5: 1001-1010.
3. Niewiarowicz A. Budowa, skład chemiczny, właściwości fizykochemiczne, funkcjonalne oraz wartość odżywcza jaj. W: *Technologia jaj*. WNT Warszawa 1991.
4. Inwook C, Changhwa J, Heedon C. Effectiveness of phosvitin peptides on enhancing bioavailability of calcium and its accumulation in bones. *Food Chem* 2005; 93: 577-583.
5. Jiang B, Mine Y. Phosphopeptides derived from hen egg yolk phosvitin: Effect of molecular size on the calcium-binding properties. *J Agric Food Chem* 2001; 65, 5, 1187-1190.
6. Lu C L, Backer R C. Effect of pH and food ingredients on the stability of egg yolk phospholipids and the metal-chelator antioxidant activity of phosvitin. *J Food Sci* 1987; 52: 613-616.
7. Lu C L, Backer R C. Characteristics of egg yolk phosvitin as an antioxidant metal-catalyzed phospholipid oxidation. *Poultry Sci* 1986; 65: 2065-2070.
8. Jiang B, Mine Y. Preparation of novel functional oligo-phosphopeptides from hen egg yolk phosvitin. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 990-994.
9. Świdorska-Kielbik A, Krakowiak A, Witczak T. Alergia zawodowa – Istotne zagrożenie zdrowia pracowników przemysłu spożywczego. *Medycyna Pracy* 2005; 6: 475-483.
10. Fevveira F, Hawranek T, Gruber P. Allergic cross-reactivity: from gene to the Żlinic. *Allergy* 2004; 59: 243-267.
11. Rudzki E. Alergia pokarmowa. Część IV – Jaja kurze. *Post Dermatol Alergol* 2007; 6: 271-273.
12. Escudero C, Quivce S, Fernandez-Nieto M. Egg white proteins as inhalant allergens associated with baker's asthma. *Allergy* 2003; 58: 618-620.
13. *Farmakopea Polska FP VII*. Warszawa 2006.
14. Lasso J N, Nakai S. A simple procedure for the isolation of phosvitin from chicken egg yolk [w:] *Egg uses and processing technologies. New developments*. Ed. Sim J.S., Nakai S. CAB International. Wallingford UK 1994.
15. Calibration kits for molecular weight determination using electrophoresis, 11-B-036-08, rev. 2, Pharmacia Biotech.
16. Juneja L R, Sugino H, Fujiki M. Preparation of pure phospholipids from egg yolk. *Egg uses and processing technologies. New developments*. Ed. Sim J. S., Nakai S. CAB International. Wallingford UK. 1994.

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. n. med. Florian Ryszka

Farmaceutyczny Zakład Naukowo-Produkcyjny „Biochefa”,

41-205 Sosnowiec, Kasztanowa 3

Tel.: 0-32/ 291-69-68

e-mail: f.ryszka@biochefa.pl

Selen – pierwiastek niezbędny dla zdrowia człowieka

Selenium – element necessary for the human health

Beata Szulc-Musioł, Lucyna Bułaś, Ewa Długosz, Anna Banyś, Andrzej Jankowski

Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: dr hab. n. farm. Andrzej Jankowski

Streszczenie

Autorzy w pracy zwrócili uwagę na znaczenie przewlekłych niedoborów selenu w rozwoju niektórych chorób. Selen jest jednym z pierwiastków śladowych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Stanowi integralny składnik około 20 enzymów, w tym peroksydazy glutationowej, dejodazy-I-5-jodotyroninowej, co decyduje o jego wielokierunkowej aktywności biologicznej. Selen odgrywa ważną rolę w zachowaniu homeostazy procesów antyoksydacyjnych, wpływa na układ hormonalny, procesy zapalne i immunologiczne.

Słowa kluczowe:Selen, niedobory, peroksydaza glutationowa, stres oksydacyjny

Abstract

In this work, the authors have put emphasis on chronic deficiency of selenium in the development of certain diseases. Selenium is one of the trace elements, which is essential for the proper functioning of the organism. It constitutes an integral part of approximately 20 enzymes which include, glutathione peroxidase, iodothyronine 5'-deiodinase, and this accounts for its multidirectional, biological activity. Selenium plays an important role in maintaining homeostasis of antioxidant processes, has an influence on the hormonal system and inflammatory and immune processes.

Key words: Selenium, deficiency, glutathione peroxidase, oxidative stress

Selen został odkryty w 1817 roku przez szwedzkiego chemika Berzeliusa, który to nazwał go od imienia greckiej bogini księżyca Selene. Dziś, prawie 200 lat później, jest uznany za istotny pierwiastek śladowy, bardzo ważny dla zdrowia ludzkiego. Źródłem selenu w diecie są zboża, produkty zwierzęce, owoce morza. Zalecana dawka dla dorosłych wynosi 50-100 µg i nie powinna przekraczać 400 µg. Stężenie selenu w organizmie zależy przede wszystkim od jego zawartości w diecie, a przyswajalność - od formy chemicznej. Łatwiej przyswajalny jest selen z postaci organicznych niż nieorganicznych [1].

Selen w organizmie człowieka wchodzi w skład około 30 białek, z których kilkanaście to selenoenzymy. W białkach enzymatycznych i innych selenobiałkach selen wbudowany jest do aminokwasu: selenocysteiny. Selenoenzymami są m.in peroksydazy glutationowe, dejodazy jodotyroninowe, reduktazy tioredoksyny, syntetaza selenofosforanu 2, selenobiałko P, selenobiałko W, selenobiałko 15kDa i inne [2,3]. Pośrednio poprzez te selenoenzymy ten mikroelement jest kofaktorem wielu procesów metabolicznych.

Najlepiej poznana rola selenu jako pierwiastka śladowego jest związana z jego aktywnością antyoksydacyjną. Selenoenzymami pełniącymi funkcję komórkowych „antyutleniaczy” są: peroksydazy glutationowe, reduktazy tioredoksyny i selenobiałko P [4].

Poza funkcją komórkowego antyoksydanta selen działa przeciwwzapalnie, przeciwwirusowo, antykancerogenicznie

i mutagennie, łagodzi przebieg choroby u osób zarażonych wirusem HIV [2,5]. Selen, jako składnik dejodazy jodotyroniny, bierze udział w produkcji hormonów tarczycy, ma zatem udział w utrzymaniu eutyreozy [6]. Odnotowano także ochronne działanie selenu w przypadku zatruc niektórymi metalami ciężkimi [7].

Niedobór selenu wiąże się głównie z uszkodzeniem mięśnia sercowego (choroba Keshan) i z chorobami układu kostnego (choroba Kashin-Becka) [8,9].

Liczne badania sugerują, że niedoborowi selenu towarzyszy pogorszenie nastroju, częstsze występowanie depresji, niepokoju i agresji [2,3]. U osób z chorobą Alzheimera i Parkinsona stwierdzono niższe stężenie selenu w tkance mózgowej w porównaniu do tkanki osób zdrowych [10].

W czasopiśmie medycznych pojawia się co raz więcej publikacji dotyczących wolnych rodników oraz reaktywnych form tlenu (RFT) i ich związku z rozwojem wielu chorób przewlekłych u ludzi. Wzrost stężenia RFT komórce świadczy o upośledzeniu funkcjonowania mechanizmów antyoksydacyjnych. Zaburzenie równowagi pomiędzy ilością powstałych RFT a systemem ich degradacji może prowadzić do stresu oksydacyjnego. Głównym mechanizmem obronnym organizmu przed RFT jest układ enzymów antyoksydacyjnych oraz antyoksydanty drobnocząsteczkowe. Podstawowymi enzymami tego układu są: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) oraz peroksydaza glutationowa (GSH-Px), której synteza zależy od stężenia selenu

w organizmie. Selen, wchodzący w skład centrum aktywnego GSH-Px, bierze pośrednio udział w eliminacji reaktywnych form tlenu [11, 12]. RFT odgrywają istotną rolę w patofizjologii takich chorób jak miażdżyca naczyń krwionośnych, choroby sercowo-naczyniowe, choroby nowotworowe, cukrzyca, przewlekła niewydolność nerek i inne. Jest wiele dowodów świadczących, że selen i selenobiałka wywierają ochronny wpływ na rozwój niektórych chorób [3,6,13].

Istnieją grupy ludzi narażonych na wystąpienie niedoborów selenu. Zapotrzebowanie na selen wzrasta szczególnie wyraźnie w okresie szybkiego wzrostu i rozwoju organizmu. Badania wielu autorów wykazały [14,15], że u kobiet ciężarnych stężenie selenu zarówno w osoczu, jak i pełnej krwi obniża się w miarę trwania ciąży, osiągając najniższe wartości tuż przed porodem. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że selen łatwo przenika przez łożysko do płodu. Rosnący płód gromadzi w swoich tkankach selen szczególnie intensywnie pod koniec trwania ciąży [16].

Niedobór selenu w okresie noworodkowym może być niekorzystny dla wcześniaków, ze względu na niedojrzałość mechanizmów obrony antyoksydacyjnej i większą w związku z tym podatność na rozwój chorób, u podłoża których stwierdza się zwiększoną aktywność wolnych rodników tlenowych, jak na przykład RDS (ang. *Respiratory Distress Syndrome*) lub retinopatia wcześniaków [17].

Udokumentowany spadek stężenia selenu u kobiet w ciąży, spowodował zainteresowanie badaczy nad rolą selenu w patologii ciąży [15,18,19]. Niedobór selenu może mieć znaczenie w rozwoju gestozy EPM (ang. *Edema, proteinuria and hypertension*). Opóźniony wzrost płodów w gestozie jest spowodowany uszkodzeniem łożyska, prawdopodobnie przez krążące nadtlenki lipidów. W innych badaniach suplementacja selenem u kobiet zagrożonych rozwojem gestozy znacząco zmniejszyła liczbę przypadków nadciśnienia indukowanego ciążą i obrzęków w porównaniu z grupą kontrolną [20].

Ważnym problemem w pediatrii jest SIDS (ang. *Sudden Infant Death Syndrome*). Winterbourn [21] w badaniach przeprowadzonych w Nowej Zelandii w latach 1990-1992, analizowała stężenie selenu w osoczu i częstość występowania SIDS u niemowląt. Autorka wykazała wysoką, ujemną korelację między stężeniem selenu w osoczu a zgonami z powodu SIDS.

Do obniżenia stężenia selenu w surowicy (i aktywności GSH-Px) dochodzi u dzieci chorujących na kwashiorkor (choroba związana z niedoborem białka i niedożywieniem), celiakię (zespół trzewny związany z wchłanianiem glutenu), fenyloketonurię czy też leczonych z powodu wtórnego złego wchłaniania [22,23,24].

W wielu innych publikacjach zwrócono również uwagę, że u pacjentów odżywianych przez dłuższy czas pozajelitowo dochodzi do poważnego obniżenia zawartości selenu w organizmie [25,26]. Roztwory podawane w całkowitym odżywianiu pozajelitowym zawierają niewielkie ilości selenu lub nie zawierają go w ogóle. Kardiomiopatię z towarzyszącym niskim stężeniem selenu we krwi opisano u dwóch mężczyzn, od kilku lat odżywianych pozajelitowo [27]. Leczenie preparatami selenu nie dało pozytywnych wyników i obaj chorzy zmarli. Pośmiertnie wykonane oznaczenie selenu i aktywności peroksydazy glutationowej (GSH-Px) wykazały, że wyniki były kilkakrotnie niższe od

wartości uzyskanych u osób zdrowych. Według autorów do nieodwracalnych zmian w mięśniu sercowym i innych narządach doszło w wyniku niedoboru selenu a przyczynowe leczenie choroby rozpoczęto zbyt późno.

Nerki są narządem o najwyższym stężeniu selenu i głównym narządem utrzymującym stałe stężenie tego pierwiastka we krwi. W nerkach produkowana jest również GSH-Px osocza. Dlatego w przypadku niewydolności tego narządu dochodzi do osłabienia obrony antyoksydacyjnej, co może skutkować powstaniem wielu powikłań u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek. Wielu autorów potwierdziło obniżenie stężenia selenu w pełnej krwi i osoczu u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek zarówno niedializowanych jak i dializowanych [28,29].

Selen wpływa na funkcjonowanie systemu immunologicznego [30]. Działa immunostymulacyjnie przez pobudzenie proliferacji limfocytów T, nasilenie odpowiedzi na antygeny i pobudzenie aktywności komórek NK oraz limfocytów cytotoksycznych. Mechanizm działania selenu jest związany z jego zdolnością do regulacji ekspresji receptora dla IL-2 na powierzchni aktywowanych limfocytów i komórek NK [31]. Po 6 miesiącach badania, u osób starszych przyjmujących selen w dawce 100 µg/dobę stwierdzono wzmocnienie odpowiedzi immunologicznej na mitogen do poziomu występującego u młodych, zdrowych osób [3].

Wykazano, że niskie stężenie selenu w organizmie zwiększa zjadliwość wirusa Cocksackie (czemu przypisuje się również znaczenie etiologiczne w chorobie Keshan) [30], przyspiesza namnażanie się wirusa HIV w komórkach oraz zwiększa ryzyko zachorowania na raka wątroby w przypadku wirusowego zapalenia wątroby typu B lub C [32].

U mężczyzn selen wpływa na zdolności reprodukcyjne i bierze udział w metabolizmie testosteronu [33]. Oldereid i wsp. [34] stwierdzili dodatnią korelację ilości selenu w ejakulacie z ilością plemników. Selen odgrywa ważną rolę w procesie reprodukcji. Podanie selenu mężczyznom z niedoborem tego pierwiastka i z zaburzeniami płodności wpływa na zwiększenie szans posiadania potomstwa, chociaż są też badania niewykazujące takiego działania.

W piśmiennictwie rozważa się rolę selenu w skórze i jej przydatkach u chorych na łuszczycę, w odniesieniu do naskórka wskazuje się na udział selenu w procesach keratynizacji, głównie poprzez tworzenie mostków dwusiarczkowych. U chorych na łuszczycę przypisuje się selenowi wpływ na parametry immunologiczne i biochemiczne zachodzące w obrębie skóry [35]. Drewa i wsp. [36] w badaniach *in vitro* stwierdzili protekcyjny wpływ selenianu na keranocyty naświetlane promieniowaniem ultrafioletowym.

Znane są również prace analizujące rolę selenu w astmie oskrzelowej. Badania te są jednak nieliczne, a wyniki niejednoznaczne. Znaczenie selenu w patofizjologii astmy oskrzelowej może wyrażać się wpływem tego pierwiastka na funkcję komórek immunologicznie kompetentnych i tkankowy odczyn zapalny [37]. Jednym z przewlekłych schorzeń o niewyjaśnionej etiologii jest reumatoidalne zapalenie stawów (RZS). Stwierdzono, że u pacjentów z RZS otrzymujących selen następuje normalizacja parametrów stanu zapalnego (białko C-reaktywne, alfa 2-globulina, PGE₂), poprawa stanu klinicznego i zmniejszenie dolegliwości [38,39].

Choroby układu krążenia są jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach wysokorozwiniętych. Wielu autorów wykazało związek pomiędzy stężeniem selenu we krwi a częstością występowania chorób sercowo-naczyniowych, chociaż są doniesienia, w których takich zależności nie stwierdzono [40,41,42]. Nieznany jest mechanizm działania selenu, przypuszcza się, że działa on poprzez GSH-Px. Niskie stężenie selenu przyczynia się do obniżenia aktywności GSH-Px i wzrostu stężenia wodoronadtlenków, których nagromadzenie może powodować uszkodzenia śródbłonna naczyń krwionośnych. Niskie stężenie może być także związane z obniżeniem metabolizmu prostaglandyn w płytkach krwi i przyczyniać się do podwyższonej lepkości płytek oraz tworzenia zakrzepów.

Większość badań epidemiologicznych pochodzących z różnych ośrodków dowiodły o istnieniu ujemnej korelacji pomiędzy umieralnością z powodu raka a spożyciem selenu i jego zawartością w diecie. Została wykryta odwrotna korelacja pomiędzy poziomem selenu a umieralnością spowodowaną rakiem przełyku lub żołądka, a także ryzykiem raka płuc [43,44]. U pacjentów z nowotworami, u których stężenie selenu we krwi było wyższe, wykazano łagodniejszy charakter guzów i mniejszą liczbę przerzutów. Te odkrycia sugerują, że dodawanie selenu do diety może mieć ochronne działanie w stosunku do niektórych rodzajów nowotworów u osób z obniżonym spożyciem selenu.

W Chinach, gdzie odnotowano dużą liczbę zachorowań na raka wątroby spowodowane wirusowym zapaleniem wątroby typu B, połączone z dużym skażeniem żywności aflatoksynami, podawanie selenu zmniejszyło częstość występowania choroby o 35% [45].

W badaniach przeprowadzonych przez Clarka i wsp. [46] wykazano, że leczenie selenem nie wpłynęło znacząco na zachorowalność na nieczerniakowe nowotwory skóry (non-melanoma), natomiast u pacjentów otrzymujących dodatek selenu do diety, ryzyko rozwoju raka płuc, gruczołu krokowego, okrężnicy czy odbyticy spadło. Zachorowalność na raka gruczołu krokowego spadła aż o 65%. Głównym wnioskiem wyciągniętym z badania był fakt, że prewencyjne działanie selenu było skuteczniejsze u pacjentów, którzy mieli niskie stężenie wyjściowe selenu, w momencie rozpoczęcia badań.

Whanger [47] na podstawie analizy wyników uzyskanych z materiału ludzkiego i od zwierząt stwierdził, że niezależnie od ilości pierwiastka zawartego w diecie, podanie selenu w ilości 100 µg a nawet 200 µg dziennie, jest konieczne aby zapobiec lub opóźnić rozwój raka. Wiąże się to z faktem, że najaktywniejsza antykancerogennie forma selenu -CH₃SeH – występuje w organizmie w wyższych stężeniach u osób przyjmujących podwyższone dawki tego pierwiastka.

Liczne doniesienia potwierdzają hipotezę, że suplementacja diety w selen powoduje obniżenie ryzyka powstania nowotworu gruczołu krokowego [48]. Selen może mieć również istotne znaczenie w zapobieganiu raka jelita grubego [49]. Clark i wsp. [50] w randomizowanych badaniach z udziałem 974 mężczyzn, przyjmujących 200 µg selenu na dobę wykazali 37% redukcję zachorowalności na raka prostaty i 2 razy mniejsze ryzyko jego rozwoju u uczestni-

ków poddanych suplementacji. Natomiast Reid i wsp. [51] poddali analizie częstość występowania gruczolaka jelita grubego u pacjentów poddanych suplementacji diety selenem. W swojej pracy udowodnili redukcję ryzyka wystąpienia gruczolaka jelita grubego w grupie palaczy papierosów i u badanych z niskim stężeniem selenu we krwi na początku badania. Pomimo że większość badań epidemiologicznych wskazuje związek pomiędzy niskim stężeniem selenu we krwi a ryzykiem rozwoju raka jelita grubego, w niektórych badaniach nie udało się wykazać tej zależności. Podobnie, badania stężenia selenu we krwi u kobiet z rakiem sutka nie dostarczyły tak zgodnych wyników, jak nad rakiem innych narządów [52]. Autorzy uważają, że brak różnic związany jest z faktem, że rozwijający się w gruczole piersiowym guz jest strukturą izolowaną, mającą niewielki związek z innymi częściami organizmu.

Wiele obszernych badań epidemiologicznych wykazuje, że suplementacja diety selenem wskazana jest, gdy podaż tego mikroelementu w żywności jest ograniczona. Problem niedoborów selenu w diecie wynikający z jego małej zawartości w środowisku (w glebie i roślinach) jest intensywnie badany, w tym też przez polskich naukowców. Ze względu na mały indeks terapeutyczny istotne jest określenie wpływu wielkości dawki selenu na przebieg choroby. Określenie znaczenia selenu w patogeniezie wielu chorób jest więc problemem nadal otwartym i wymagającym dalszych badań.

Piśmiennictwo

1. Finley J.W.: Bioavailability of selenium from foods. *Nutr. Rev.* 2006, 64(3): 146-51.
2. Arthur J.R. i wsp.: Selenium in the immune system. *J. Nutr.* 2003, 133(5): 1457-59.
3. Rayman M.P.: The argument for increasing selenium intake. *Proc. Nutr. Soc.* 2002, 61: 203-15.
4. Papp L.V. i wsp.: From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid. Redox Signal.* 2007, 9(7): 775-806.
5. Rayman M.P.: The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000, 356: 233-41.
6. Rayman M.P., i wsp.: Randomized controlled trial of the effect of selenium supplementation on thyroid function in the elderly in the United Kingdom. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008, 87(2): 370-78.
7. Seppanen K. i wsp.: Effect of supplementation with organic selenium on mercury status as measured by mercury in public hair. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2000, 14: 84-87.
8. Yamamuro T.: Kashin-Beck disease: a historical overview. *Int. Orthop.* 2001, 25(3): 134-37.
9. Moreno-Reyes R. i wsp.: Selenium and iodine supplementation of rural Tibetan children affected by Kashin-Beck osteoarthropathy. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003, 78: 137-44.
10. Atroshi F. i wsp.: The role of selenium in epilepsy and other neurological disorders. *Epileptologia* 2007, 15: 211-24.
11. Stanczyk M. i wsp.: Roles of reactive oxygen species and selected antioxidants in regulation of cellular metabolism. In: *J. Occup. Med. Environ. Health* 2005, 18: 15-26.

12. Tapiero H. i wsp.: The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed. Pharmacother.* 2003, 57: 134-44.
13. Navarro-Alarcon M., Lopez-Martinez M.C.: Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci. Total Environ.* 2000, 249: 347-52.
14. Zachara B., Pilecki A.: Daily selenium intake by breast-fed infants and the selenium concentration in the milk of lactating women in western Poland. *Med. Sci. Monitor.* 2001, 7: 1002-04.
15. Orhan H. i wsp.: Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2003, 267(4): 189-95.
16. Zachara B.A. i wsp.: Selenium levels in kidney, liver and heart of newborns and infants. *Early Hum. Dev.* 2001, 63(2): 103-11.
17. Falciglia H.S. i wsp.: Role of antioxidant nutrients and lipid peroxidation in premature infants with respiratory distress syndrome and bronchopulmonary dysplasia. *Am. J. Perinatol.* 2003, 20(2): 97-107.
18. Gromadzińska J. i wsp.: Selenium levels, thiobarbituric acid-reactive substance concentrations and glutathione peroxidase activity in the blood of women with gestosis and imminent premature labour. *Analyst.* 1998, 123(1): 35-40.
19. Tan M. i wsp.: Changes of serum selenium in pregnant women with gestational diabetes mellitus. *Biol. Trace Elem. Res.* 2001, 83(3): 231-37.
20. Han L., Zhou S.M.: Selenium supplement in the prevention of pregnancy induced hypertension. *Chin. Med. J. (Engl.)* 1994, 107(11): 870-71.
21. Winterbourn C. C.: Dietary selenium. *New Zeal. Med. J.* Nov. 1992, 25: 481-487.
22. Manar M.J. i wsp.: Selenium status, kwashiorkor and congestive heart failure. *Acta Paediatr.* 2001, 90(8): 950-52.
23. Yuce A. i wsp.: Serum carnitine and selenium levels in children with celiac disease. *Indian J. Gastroenterol.* 2004, 23(3): 87-88.
24. Dobbelaere D. i wsp.: Evaluation of nutritional status and pathophysiology of growth retardation in patients with phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2003, 26(1): 1-11.
25. Kanekura T. i wsp.: Selenium deficiency: report of a case. *Clin. Exp. Dermatol.* 2005, 30(4): 346-48.
26. Ishida T. i wsp.: Selenium deficiency in a patient with Crohn's disease receiving long-term total parenteral nutrition. *Intern. Med.* 2003, 42(2): 154-57.
27. Winnefeld K. i wsp.: Selenium in serum and whole blood in patients with surgical interventions. *Biol. Trace Elem. Res.* 1995, 50: 149-155.
28. Zachara A.B. i wsp.: Red blood cell and plasma glutathione peroxidase activities and selenium concentration in patients with chronic kidney disease: A review. *Acta Bioch. Pol.* 2006, 53(4): 663-77.
29. Zachara A.B. i wsp.: Selen i niektóre selenoenzymy we krwi chorych z przewlekłą niewydolnością nerek. *Voletudinaria-Post. Med. Klin. Wojsk.* 2005, 10(2): 79-88.
30. Zagrodzki P.: Selen a układ odpornościowy. *Post. Hig. Med. Dośw.* 2004, 58: 140-49.
31. Hoffmann P.R.: Mechanisms by which selenium influences immune responses. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2007, 55(5): 289-97
32. Lin C.C., Huang J.F., Tsai L.Y., Huang Y. L.: Selenium, iron, copper, and zinc levels and copper-to-zinc ratios in serum of patients at different stages of viral hepatic diseases. *Biol. Trace Elem. Res.* 2006, 109(1): 15-24
33. Beckett G. J, Arthur J.R.: Selenium and endocrine systems. *J. Endocrinol.* 2005, 184(3): 455-65
34. Oldereid N.B. i wsp.: Selenium in human male reproductive organs. *Human Reproduction.* 1998, 13: 2173.
35. Serwin A.B. i wsp.: Selenium supplementation, soluble tumor necrosis factor-alpha receptor type 1, and C-reactive protein during psoriasis therapy with narrowband ultraviolet B. *Nutrition.* 2006, 22(9): 860-64.
36. Drewna T. i wsp.: Wpływ selenianu na apoptozę keranocytów indukowaną promieniowaniem ultrafioletowym w hodowli pierwotnej. *Prz. Dermatol.* 2006, 93(2): 253-57.
37. Rogala B. i wsp.: Stężenie selenu we krwi pełnej i osoczu chorych na astmę oskrzelową. *Alerg. Astma Immunol.* 2002, 7(3): 147-50.
38. Prabhu K.S. i wsp.: Selenium deficiency increases the expression of inducible nitric oxide synthetase in RAW 264.7 macrophages: role of nuclear factor-κB in up-regulation. *Biochem. J.* 2002, 366: 203-07.
39. Zamamiri-Davies F. i wsp.: Nuclear factor-κB mediates over-expression of cyclooxygenase-2 during activation of RAW 264.7 macrophages in selenium deficiency. *Free Radic. Biol. Med.* 2002, 32: 890-94.
40. Flores-Mateo G. i wsp.: Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006, 84(4): 762-73.
41. Zagrodzki P., Łaszczyk P.: Selen a choroby układu sercowo-naczyniowego – wybrane zagadnienia. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2006, 60: 624-31.
42. Stranges S. i wsp.: Effects of selenium supplementation on cardiovascular disease incidence and mortality: secondary analyses in a randomized clinical trial. *Am. J. Epidemiol.* 2006, 163(8): 694-99.
43. Duffield-Lillico A.J. i wsp.: Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2002, 11: 630-639.
44. Wei W.Q., i wsp.: Prospective study of serum selenium concentrations and esophageal and gastric cardia cancer, heart disease, stroke, and total death. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79: 80-85.
45. Yu S.Y. i wsp.: A preliminary report on the intervention trials of primary liver cancer in high-risk populations with nutritional supplementation of selenium in China. *Biol. Trace Elem. Res.* 1991, 29: 289-94.
46. Clark L.C. i wsp.: Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin: a randomized controlled trial: Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA* 1996, 276: 1957-63.
47. Whanger P.D.: Selenium and its relationship to cancer: an update. *Br. J. Nutr.* 2004, 91: 11-28.

48. Peters U. i wsp.: Serum selenium and risk of prostate cancer-a nested case-control study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007, 85(1): 209-17.
49. Nelson M.A. i wsp.: Studies into the anticancer effects of selenomethionine against human colon cancer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2005, 1059: 26-32.
50. Clark L.C. i wsp.: Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. *Br. J. Urol.* 1998, 81: 730-34.
51. Reid M.E. i wsp.: Selenium supplementation and colorectal adenomas: an analysis of the nutritional prevention of cancer trial. *Int. J. Cancer.* 2006, 118: 1777-81.
52. Gromadzińska J. i wsp.: Lipid peroxide levels and antioxidant enzyme activities in blood of breast cancer patients. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 1992, 13: 127-35.

Adres do korespondencji:

Beata Szulc-Musioł

Śląski Uniwersytet Medyczny,

Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej,

ul. Kasztanowa 3, 41-200 Sosnowiec

tel.: +48 (32) 291 84 23; e-mail: bszulc@sum.edu.pl

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF NEW PYRIMIDINE DERIVATIVES AND 1, 2, 3, 4-TETRAHYDROPYRIMIDO[4,5-d] PYRIMIDINES

Department of Organic Chemistry,
Medical Academy, Wrocław

Jerzy Cieplik

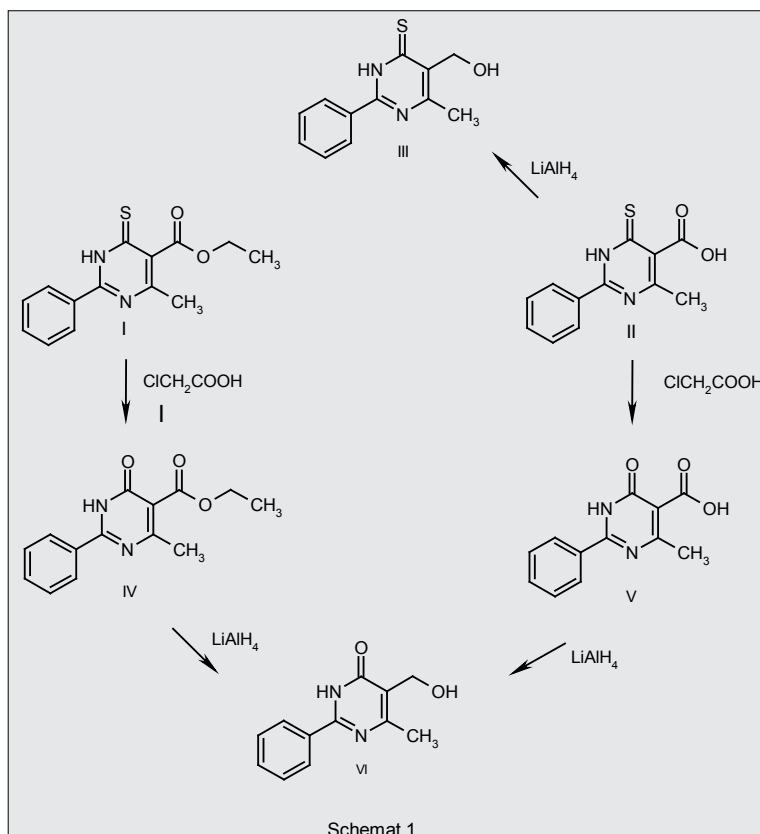
Abstract

In the first part a decision was made to substitute a sulphur atom in the pyrimidine ring with an oxygen atom, and compare anti-bacterial properties of resulting compounds. Then, 5-hydroxyeter-derivatives and 5-aminohydroxy-hetero-derivatives of pyrimidine were obtained and their microbiological activity tested. In the further part, a set of pyrimidine sulphonamides were obtained and their biological properties compared. In the final part of the study, a Mannich reaction was realised in a pyrimidine system, obtaining 1,2,3,4-tetrahydropyrimid-[4,5-d]-pyrimidine. Using various aromatic aldehydes a set of new derivaties were obtained, having interesting microbiological properties.

Keywords: Pyrimidines, sulfonamidoderivatives, antibacterial activity

1. SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF 4-THIOXO- AND -PYRIMIDINE 4-OXO-5-DERIVATIVE

Ethyl 2-phenyl-6-methyl-4-thioxo-5-pyrimidinecarboxylate I) was used as a parent substance which was then hydrolyzed to 2-phenyl-6-methyl-4-thioxo-5-pyrimidinecarboxylic acid (II). Carboxylic was reduced with LiAlH_4 (lithium tetrahydroaluminate) yielding 2-phenyl-5-hydroxymethyl-6-methyl-4-thioxopyrimidine (III). In addition, the sulfur atom at position "4" of the pyrimidine ring was substituted with the oxygen atom since such a change in the system, according to the literature reports may increase biological activity and at the same time may reduce the toxicity of the derivatives obtained. This way ethyl 2-phenyl-6-methyl-4-oxo-5-pyrimidinecarboxylate (IV) and 2-phenyl-6-methyl-4-oxo-5-pyrimidinecarboxylic acid (V) were prepared. Both these newly prepared compounds IV and V were reduced with LiAlH_4 dissolved in dioxane (Scheme 1) ⁽¹⁾.



2. SYNTHESIS OF PYRIMIDINE 5-HYDROXYETHER AND 5-AMINOHYDROXYETHER DERIVATIVES

According to earlier suggestions proposed by Japanese chemists who modified the Sparsomycin antibiotic, it was decided to prepare pyrimidine 5-hydroxyether and 5-alkylaminohydroxyether derivatives. Literature reports indicate that the substitutes occurring in position "5" of the pyrimidine ring have an essential effect on biological properties in this ring.

2-phenyl-6-methyl-4-thioxo-5-pyrimidinecarboxylic acid (II) was used as a parent substance. Acid II was fused with various aromatic amines yielding 4-arylamino-2-phenyl-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid (VII). Acid VII was reduced with LiAlH_4 yielding 4-aryl-2-phenyl-5-hydroxymethyl-6-methylpyrimidine (VIII). Hydroxymethylpyrimidine VIII was converted into sodium alcoholates with pyrimidine derivative (IX). Compound IX was treated with epichlorhydrine, yielding 4-aryl-amine-2-phenyl-6-methyl-5-epoxypropoxymethylpyrimidine (X). 4-arylamino-2-phenyl-6-methyl-5-epoxypropoxypyrimidines (X) prepared were transitional intermediate products for further syntheses. By treating pyrimidine 5-epoxy derivative with NaOH solution in methanol, pyrimidine 5-dihydroxyepoxy derivatives (XI) were obtained. Compound (X) was treated with various amino alcohols, aliphatic, aromatic and heterocyclic amines.

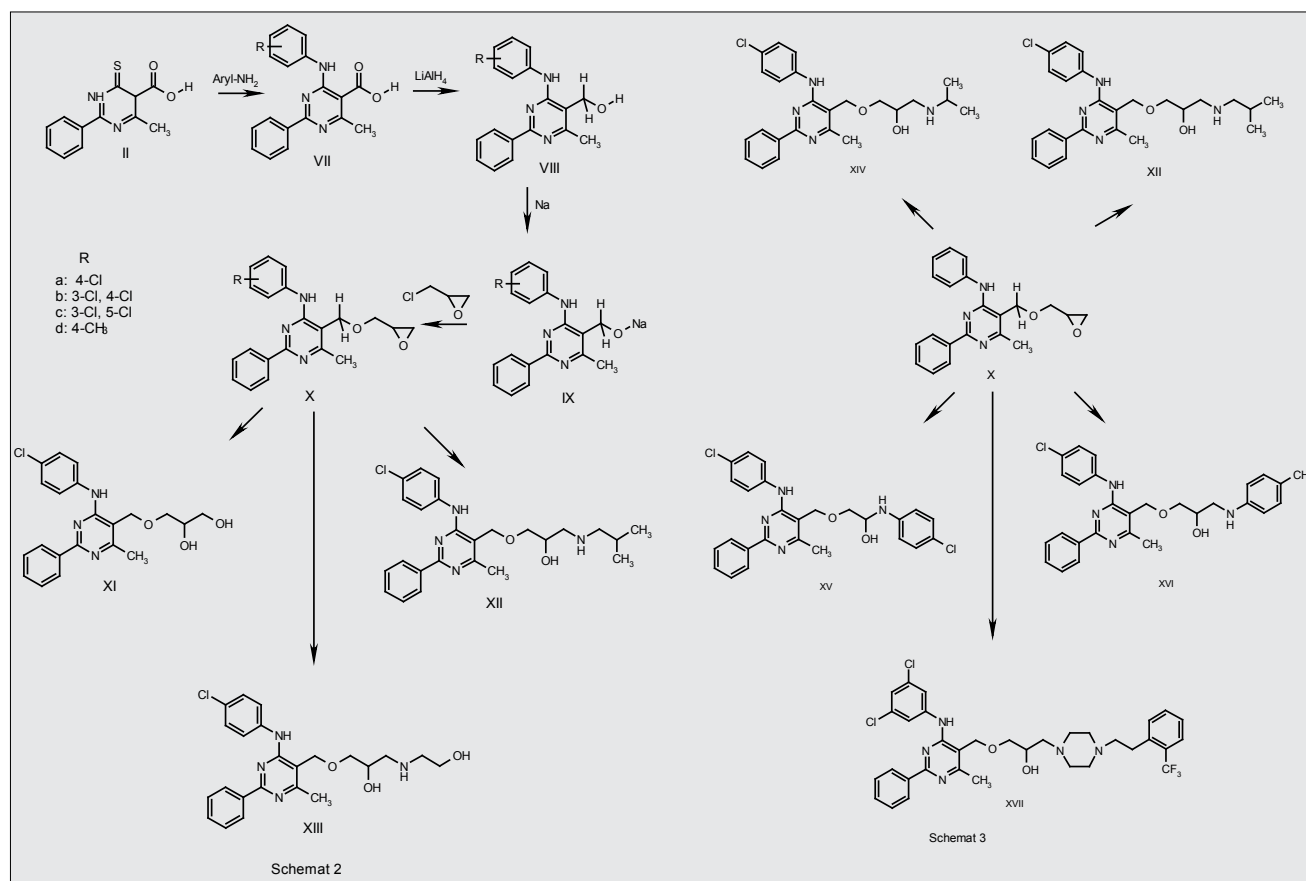
Derivatives XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII were subject to microbiological tests on five selected bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas*

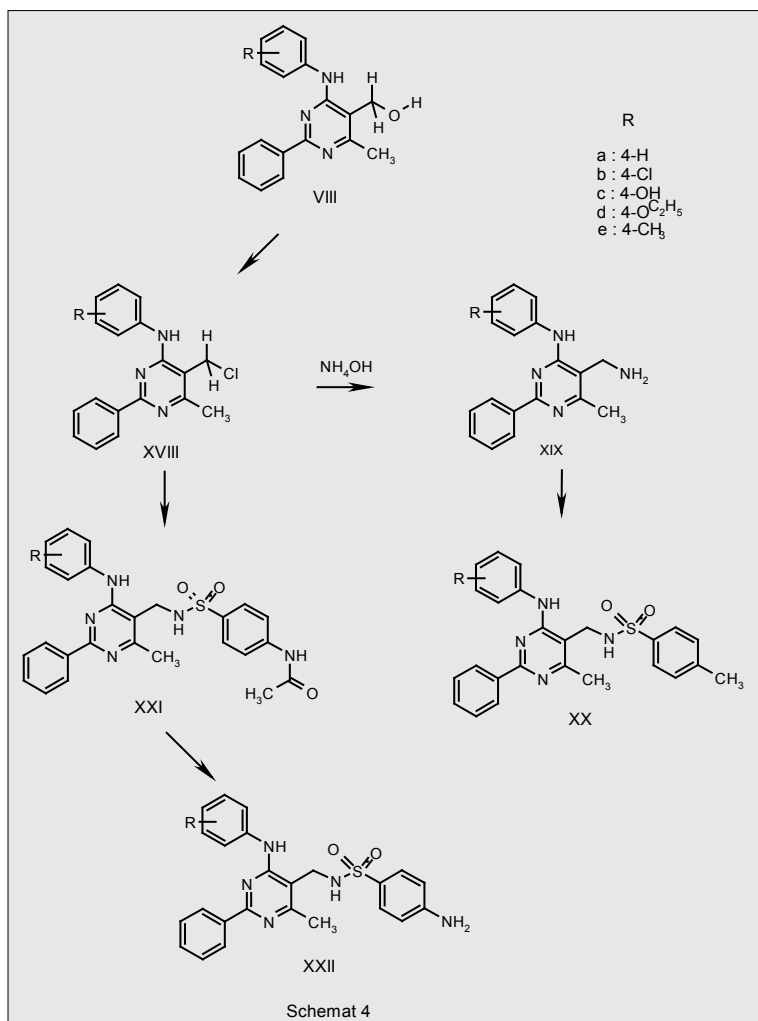
aeruginosa. From among a number of compounds investigated, the most interesting properties were shown by compound XVII with the trifluoromethylphenylethylpiperazinehydroxypropoxymethyl substitute and also with the 5-alkylaminohydroxy-propoxymethylene substitute (XII). These compounds inhibited the growth of *Staphylococcus epidermidis* in 12 $\mu\text{g/ml}$ doses and *Escherichia coli* in 6 $\mu\text{g/ml}$ doses (Scheme 2 and 3) ⁽²⁾.

3. SYNTHESIS AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF PYRIMIDINE-5-SULFONAMIDE DERIVATIVES

Literature data show that nitrogen atoms result in a decrease of electronic density at "CH" groups of the pyrimidine ring, that is, at positions 2, 4, 6. Therefore, the same substitutes behave in a different way and affect differently the pyrimidine ring depending on their positions, either at position "4" or position "5" of the pyrimidine ring. The NH_2 , OH groups at positions 2, 4, 6 reduce the aromaticity of the pyrimidine ring without giving typical diazotization reactions and reactions with FeCl_3 . On the other hand, the same groups at position "5" increase the aromaticity of the pyrimidine ring, undergoing the diazotization reaction – (NH_2) and the reaction with FeCl_3 – (OH). Therefore, it was advisable carrying out a number of syntheses aiming at the preparation of a series of pyrimidinesulphonamides, substituted at positions "4" and "5", having in mind pyrimidinesulphonamides used earlier in medical treatments.

4-Aryl-2-phenyl-6-methyl-5-hydroxymethylpyrimidine (VIII) was the parent substance in these studies. It was treated with SOCl_2 yielding 4-arylamino-5-chloromethyl-2-

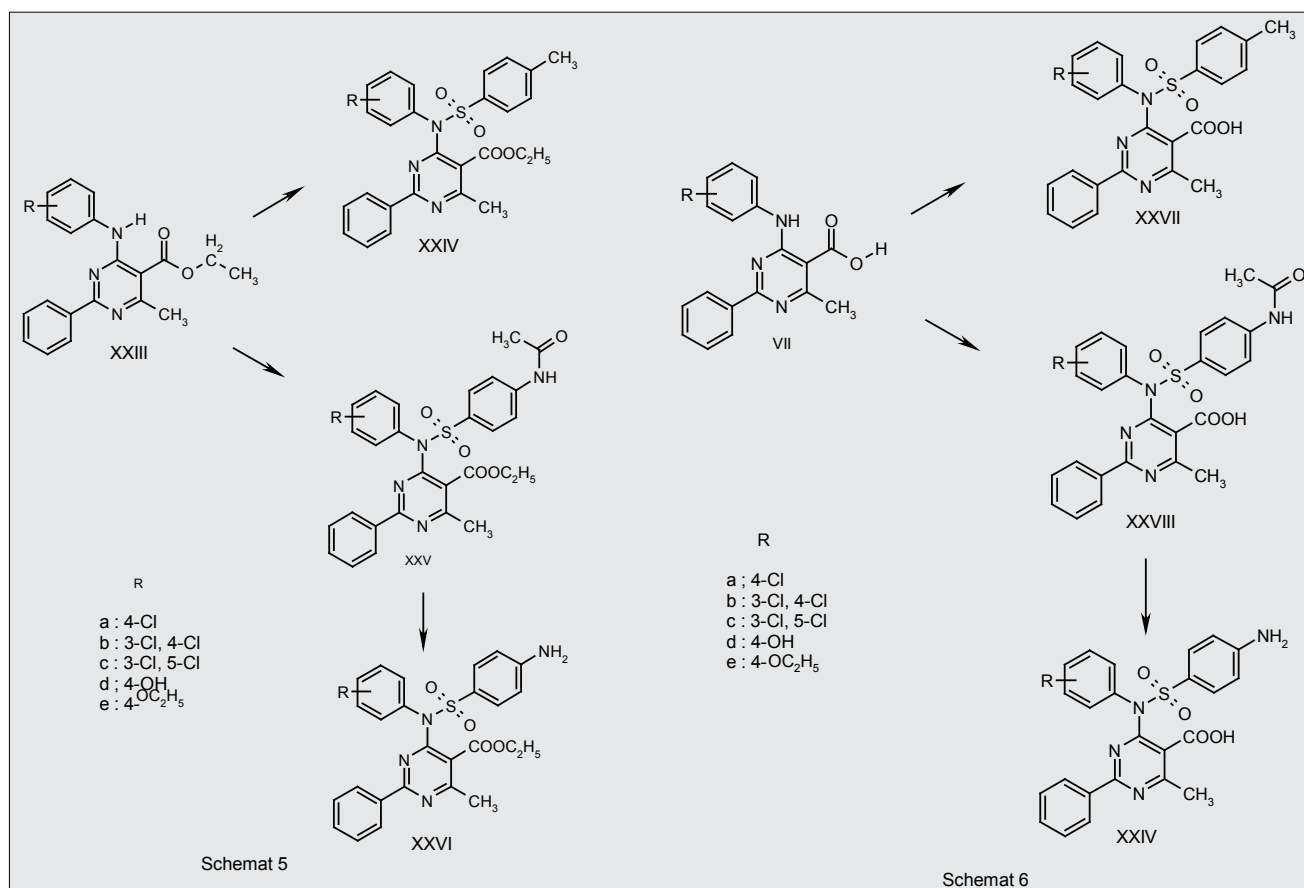




-phenyl-6-methylpyrimidine (VIII). Resulting pyrimidine chloroderivative XVIII was subject to ammonolysis with 25% NH₃ · H₂O solution yielding 5-aminomethyl-4-arylamino-2-phenyl-6-methylpyrimidine (XIX). Compound XIX was condensed with p-toluenesulfonic chloride, yielding pyrimidine 4-arylamino-2-phenyl-6-methyl-5[(4methylphenyl) sulfonamidomethyl] (XX). On the other hand, treating pyrimidine chloro derivative XVIII with 4-acetaminophenylsulfonamide, pyrimidine 3-arylamino-2-phenyl-2-phenyl-6-methyl-5-[(4-acetaminophenyl)sulfonamidomethyl] (XXI) was obtained. Sulfonamide XXI prepared was hydrolyzed with the HCl solution yielding pyrimidine 4-aryl-2-phenyl-6-methyl-5-[(4-aminophenyl)sulfonamidomethyl] (XXII) (scheme 4) ⁽³⁾.

4. SYNTHESIS AND ANTIBACTERIAL PROPERTIES OF PYRIMIDINE-4-SULFONO-DERIVATIVES ACID AND ESTERS

In continuation of our previous studies concerning different effects of the same substitutes at positions “4” and “5”, it was decided to carry out a number of syntheses aiming at preparing a series of pyrimidine 4-sulfonyl derivatives and then investigating their biological activities in order to compare with pyrimidine 5-sulfonyl derivatives prepared earlier. A number of analogous syntheses were carried out in order to



obtain pyrimidine 4-sulfonamido derivatives. The reactions were carried out on both ethyl esters of 4-arylamino-2-phenyl-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid (XXIII) and on 4-arylamino-2-phenyl-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid (VII) in order to compare their antibacterial action with those pyrimidine 5-sulfonamido derivatives obtained earlier. The parent substance in these syntheses was ethyl ester of 4-arylamino-2-phenyl-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid (XXIII) which was condensed with p-toluenesulfonic chloride and with p-acetaminophenylsulfonic chloride yielding ethyl ester of 4-[[4-(4-chlorophenyl)]-4-[(4-methylphenyl)sulfonyl]amino]-2-phenyl-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid (XXV). Compound (XXV) was then subject to acid hydrolysis yielding ethyl ester of 4-[[4-(aminophenyl)sulfonyl]-4-[(4-chlorophenyl)amino]]-2-phenyl-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid (XXVI) ⁽⁴⁾.

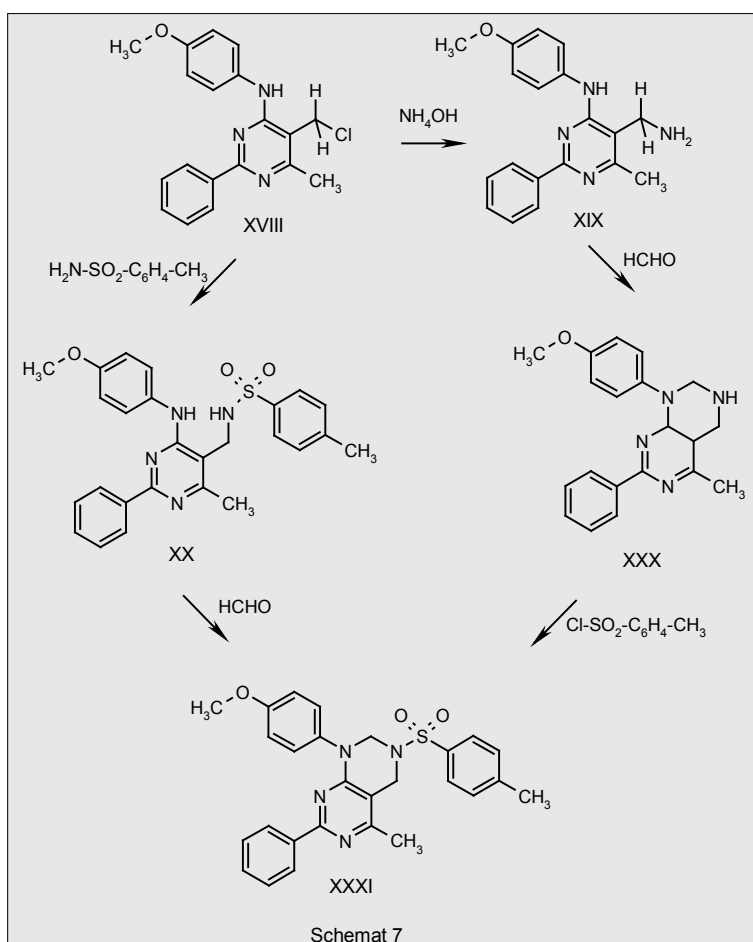
The results of these studies (scheme 5).

Similar syntheses were carried out using pyrimidine-5-carboxylic acid VII as parent substance. Treating 4-aryl-2-phenyl-5-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid (VII) with p-toluenesulfonic chloride yielded 4-[[4-(4-chlorophenyl)-4-(4-methylphenyl)sulfonyl]amino]-6-methylpyrimidino-5-carboxylic acid (XXVII) and 4-[[4-(4-(acetaminophenyl)sulfonyl)-4-(4-chlorophenyl)amino]-2-phenyl-6-methyl-5-pyrimidinocarboxylic acid (XXVIII). Then compound XXVIII was subject to acid hydrolysis yielding 4-[[4-(aminophenyl)sulfonyl]-4-(4-chlorophenyl)amino]-2-phenyl-6-methylpyrimidine-5-carboxylic acid (XXIX) ⁽⁵⁾, (Scheme 6).

5. SYNTHESIS OF 1,2,3,4-TETRAHYDROPYRIMIDO[4,5-d]PYRIMIDINE-3-SULFONO DERIVATIVES

Earlier syntheses of pyrimidine[4, 5-d][1, 3]oxazines showed that the derivatives prepared have strong antibacterial properties. In order to obtain the structures similar to the highly active chemical therapeutic agents used currently, such as quinolone compounds (pipemidic acid), pyromidic acid), a synthesis process was carried out, resulting in combined compounds of the pyrimidine ring with another pyrimidine ring. Combining 1, 2, 3, 4-tetrahydropyrimido[4,5-d]pyrimidine with the sulfonamide radical seemed to be interesting and advisable. This was achieved by two independent methods.

In the first method 2-phenyl-4-[(4-methoxyphenyl)amino]-6-methyl-5-chloromethylpyrimidine (XVIII) was used as the parent substance. By condensing it with p-toluenesulfonamide yielded 2-phenyl-4-[(4-methoxyphenyl)amino]-6-methyl-5-[(4-methylphenyl)sulfonamido-methyl]pyrimidine (XX). Then the Mannich reaction was carried out on compound (XX) by cyclizing intermediate product (XX) to 7-phenyl-1-(4-methoxyphenyl)-3-(4-methylphenyl)



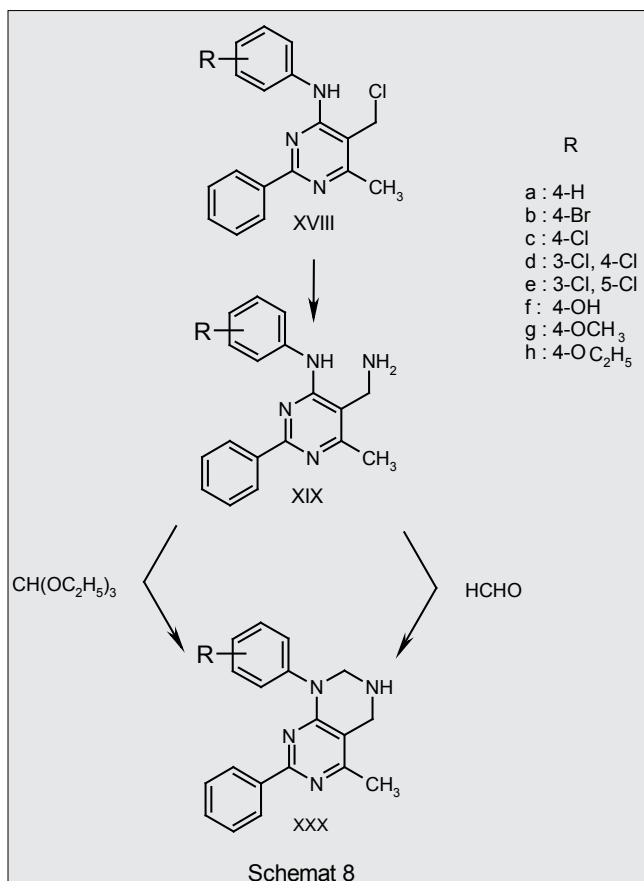
sulfonyl-5-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimido[4.5-d]pyrimidine (XXXI).

In the second method which was found to be more efficient, chloroderivative (XVIII) was treated with 25% ammonia solution yielding 2-phenyl-4-(4-methoxyphenyl)amino-6-methyl-5-aminomethylpyrimidine (XIX). 5-aminoderivative (XIX) was cyclized by means of formaldehyde, yielding 7-phenyl-1-(4-methoxyphenyl)-5-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimido[4,5-d]pyrimidine (XXX) which was then condensed with p-toluenesulfonic chloride, resulting once again in compound (XXXI) ⁽⁷⁾, (Scheme 7).

6. SYNTHESIS AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF 1, 2, 3, 4-TETRAHYDROPYRIMIDO[4,5-d]PYRIMIDINE DERIVATIVES

During our work on synthesis of 1,2,3,4-tetrahydropyrimido[4,5-d]pyrimidines, these compounds were also prepared by two independent methods. One of the methods was cyclization of 5-aminomethyl-2,4-diphenyl-6-methylpyrimidine (XIX) which was earlier prepared from pyrimidine 5-chloro derivative (XVIII) by means of ethyl orthoformate, yielding 1,7-diphenyl-5-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimido[4,5-d]pyrimidine (XXX). Identical compound was prepared by cyclizing pyrimidine 5-amino derivative XIX in the Mannich reaction (Scheme 8).

As a result of nucleophilic substitution of pyrimidine 5-chloro derivative XVIII with the amine group and then cyclizing pyrimidine 5-amino derivatives XIX by the Man-



nich method to 1,2,3,4-tetrahydropyrimido[4,5-d]pyrimidines XXX. These papers were published in **SCIENTIA PHARMACEUTICA Oesterreichische Pharmazeutische Gesellschaft** (2003), 79, (3), 245-252.

7. SYNTHESIS AND MICROBIOLOGICAL PROPERTIES OF 1, 2, 3, 4-TETRAHYDROPYRIMIDO[4, 5-d]PYRIMIDINE 3-ALKYL AND 3-ARYL DERIVATIVES

Earlier syntheses described in the previous section and their interesting results encouraged me to carry out further research work in this system. By treating pyrimidine 5-chloro derivative XVIII with various aliphatic and aromatic amines, 5-amino-substituted derivatives XXXIV and XXXV were prepared which were later cyclized in the Mannich reaction since this method was found to be more efficient than those two presented earlier. 1,2,3,4-tetrahydropyrimido[4,5-d]pyrimidine 3-alkyl and 3-aryl derivatives XXXVI, XXXVII were obtained (Scheme 10). Aliphatic and aromatic amine compounds XXXIV, XXXV and their derivatives of 1,2,3,4-tetrahydropyrimido[4,5-d]pyrimidines XXXVI, XXXVII were investigated for their antibacterial activity^(8,9) (Scheme 10).

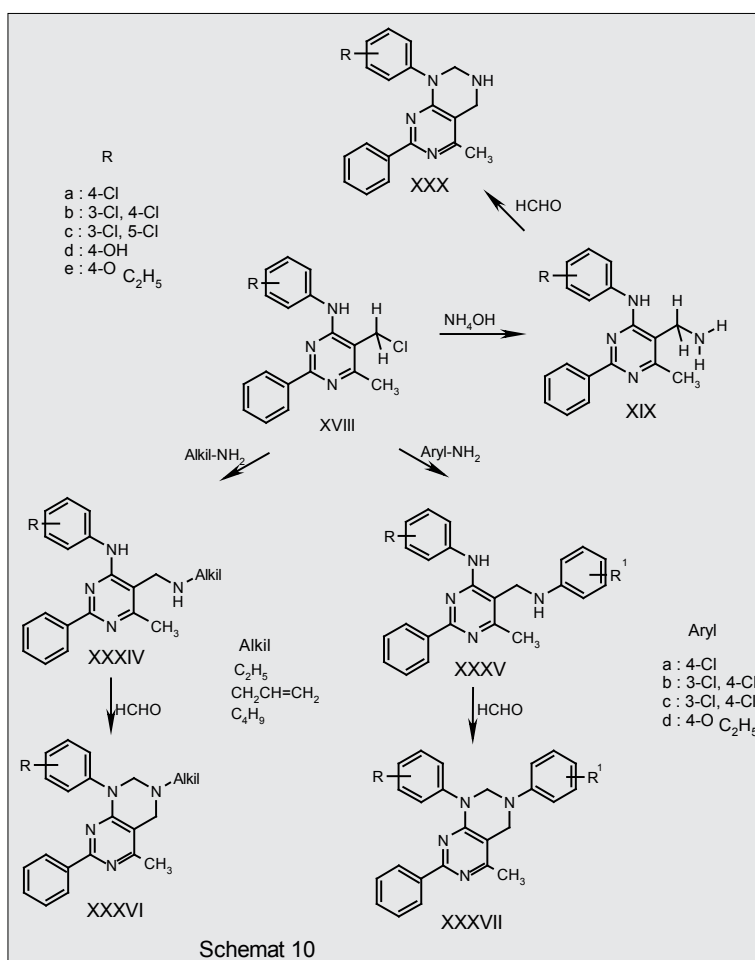
8. SUMMARY and CONCLUSIONS

As a result of syntheses described in the postdoctoral thesis, over 200 new compounds were pre-

pared and their structures were confirmed by spectroscopic studies: ¹H NMR, infrared spectroscopy (IR), mass spectroscopy as well as elementary analysis. The configuration of certain structures was also demonstrated by the chemical method, by preparing the same compounds by two different, independent chemical methods. From among all newly prepared derivatives about 150 selected compounds were investigated with respect to their microbiological properties, both in antibacterial and antifungal tests. Other 50 compounds were subject to cytostatic and immunological tests. The results of antineoplastic and immunological tests were quite often very interesting; however, they were not discussed in the present paper, with attention focused only on their microbiological activity.

In a number of reductions of 2-phenyl-5-methyl-4-thioxo-5-pyrimidinecarboxylic acid II, LiAlH₄ (lithium tetrahydroaluminate) was used as reducing agent. Reductions were initially carried out in dioxane which was later replaced with THF (tetrahydrofuran) which was found to be a much better solvent for such reactions. Interesting antibacterial results were shown by 2-phenyl-6-methyl-4-oxo-5-pyrimidinecarboxylic acid (V) in which replacing of the sulfur atom at position "4" of the pyrimidine ring with the oxygen atom increases its antibacterial properties and decreases toxicity of the compound.

In the next stage of studies, the sulfur atom at position "4" of the pyrimidine ring was substituted with various aromatic amines by fusing the respective amines with 2-phenyl-6-methyl-4-thioxo-5-pyrimidine carboxylic acid. Further reduction of the carboxylic group to the hydroxymethyl group at



position "5" of the pyrimidine ring was carried out by means of both LiAlH_4 and NaBH_4 (sodium tetrahydroborate). Pyrimidine 5-hydroxymethyl derivatives VII were converted into alcoholates in benzene. Final products were prepared by treating intermediate 5-epoxypropoxymethylpyrimidine X with respective aliphatic or aromatic amines, conducting the reactions in benzene at solvent boiling point. Pyrimidine 5-alkylaminohydroxyethers XII prepared and heterocyclic derivatives of pyrimidine hydroxyethero-5-substitutes XVII inhibited to large extent the growth of bacterial strains. From among a number of compounds investigated the most interesting results were demonstrated by compound XVII with a trifluoromethyl-phenylethylpiperazinehydroxypropoxymethylene substitute as well as with a 5-alkylaminehydroxypropoxymethyl substitute (XII). These compounds inhibited the growth of *Staphylococcus epidermidis* in 12 µg/ml doses and *Escherichia coli* of 6 µg/ml.

5-hydroxymethyl derivatives of pyrimidine VII were converted into pyrimidine 5-chloromethyl derivatives XVIII by means of SOCl_2 in benzene. Pyrimidine 5-chloro derivative XVIII was treated with 25% aqueous ammonia solution yielding pyrimidine 5-amino derivative XIX which was condensed with 4-toluenesulfonic chloride in benzene resulting in sulphonamide XX. A number of sulphonamides were prepared by treating directly pyrimidine 5-chloromethyl derivative XVIII with 4-acetaminophenylsulphonamide. Then 5-sulphonamide derivatives

XXI were hydrolyzed yielding sulphonamides XXII. 13 still undescribed 5-sulphonamide derivatives XX, XXI and XXII were obtained which were subject to microbiological tests on ten selected strains: *Escherichia coli*, *Enterobacter faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*.

The results of microbiological tests demonstrated that the amino group in the benzene ring of the sulphonamide radical increases considerably the microbiological activity while the presence of the alkyl group at the benzene ring of the sulphonamide radical decreases definitely inhibition of the growth of bacterial strains. Also the substitute at carbon "4" of the pyrimidine ring is not unimportant. Activities of the compounds are particularly enhanced by electronegative substitutes, e.g. "Cl". It is also promising that the compounds obtained inhibit the growth of some fungi, for instance *Candida albicans*.

Literature reports indicate that the nitrogen atoms in the pyrimidine result in a decrease in electronic density at "CH" groups adjacent to the nitrogen atoms, that is, positions 2, 4, 6. Therefore, the same substitutes behave in a different way and have a different effect on the pyrimidine ring and thereby on the biological properties depending on their positions at "4" or "5" of that ring. The NH_2 , OH groups at positions 2, 4, 6 decrease the aromaticity of the pyrimidine ring without giving a characteristic diazotization reaction and reaction with FeCl_3 . On the other hand, the same groups at position "5" increase the aromaticity of the pyrimidine ring, undergoing the diazotization reaction – (NH_2) and reaction

with $\text{FeCl}_3 - (\text{OH})$. Therefore, it was advisable carrying out a number of syntheses aiming at preparation of a series of pyrimidinesulfonamides, substituted in positions "4" and "5", having in mind pyrimidine sulfonamides used earlier in medical care.

Ethyl esters of pyrimidine 4-sulfamide derivatives XXIV, XXV and XXVI (scheme 5) were prepared by treating ethyl 4-arylamino-2-phenyl-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylate XXIII with appropriate p-toluenesulfonic chloride or 4-acetaminophenylsulfonic chloride in the presence of THF. In the latter case derivatives XXV were hydrolyzed by unblocking the amino group. Biological activity is enhanced by electronegative substitutes, such as, for example, a halogen atom in the benzene ring at position 4 of the pyrimidine ring (Scheme 5). On the other hand, hydrolyzing the ester group in compounds XXIV, XXV and XXVI to carboxylic acids XXVII, XXVIII, XXIX enhanced considerably antibacterial activity of the compounds prepared (scheme 6).

Earlier work on synthesis of highly biologically active pyrimidino[4,5-d][1.3]oxazines as well as the work on quinolonic chemical therapeutical agents carried out during my foreign period of service in the Viennese University of Technology encouraged me to carry out cyclization of 4,5-diamino derivatives of pyrimidine to the 1, 2, 3, 4-tetrahydropyrimido[4,5-d]pyrimidine system since the initial attempts of cyclizing unsubstituted pyrimidine 5-aminomethyl derivative gave promising results (scheme 8).

Good results of preliminary work on cyclization of 1, 2, 3, 4-tetrahydropyrimido[4,5-d]pyrimidines and high biological activity of the compounds prepared induced me to expand these studies. Therefore, on treating pyrimidine 5-chloromethyl derivative XVIII with various amines, both aliphatic and aromatic, 5-alkylamino derivatives of pyrimidine XXXIV and 5-arylamino derivatives XXXV were prepared and these were later cyclized in the Mannich reaction. 1, 2, 3, 4-Tetrahydropyrimido[4,5-d]pyrimidine derivatives prepared demonstrate extremely good antibacterial results if a highly electronegative substitute, for instance, chlorine atom is attached to the benzene ring at the first nitrogen atom. On the other hand, out of alkyl substitutes at position "3", allyl radical has the most positive effect on increasing the biological activity; however, extending the chain further results in decreasing the antibacterial properties.

Fifteen aromatically substituted 1, 2, 3, 4-tetrahydropyrimido[4.5-d] pyrimidine derivatives XXXVII were microbiologically tested on 9 bacterial strains: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Serratia inarcescens*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*. 1, 2, 3, 4-Tetrahydropyrimido[4,5-d]pyrimidine derivatives XXXVII mentioned above demonstrate extremely good antibacterial properties if there is the benzene ring with a highly electronegative substitute, for instance, chlorine atom in position "1" while at position "3" in the second benzene ring an electropositive substitute is located which enhances the solubility of a given compound, affecting indirectly the increase of its biological activity.



Piśmiennictwo:

1. J. Pluta, O. Gubrynowicz, J. Cieplik: „*Synthesis and biological properties of 4-hydroxy, 4-thio-5-pyrimidine derivatives*”, **BOLLETTINO CHIMICO FARMACEUTICO – Rivista di Scienze Farmaceutiche e Biologiche** : (1999), **138**, 30-33.
2. J. Cieplik, J. Pluta, G. Meler: *ynthesis and biological investigations of pyrimidine derivatives*”, w **Archiv der Pharmazie An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry** : (1997), **8**, (330), 237-241.
3. J. Cieplik, J. Pluta, O. Gubrynowicz: „*Synthesis and antibacterial activity of new sulfonamides of pyrimidine*“, **SCIENTIA PHARMACEUTICA Osterreichische Pharmazeutische Gesellschaft**: (2000), (4), **68**, 333-341.
4. J. Cieplik, J. Pluta, O. Gubrynowicz: “*Synthesis and bacterial properties of ethyl 4-sulfonamido pyrimidine 5-carboxylate derivatives*”, **BOLLETTINO CHIMICO FARMACEUTICO – Rivista di Scienze Farmaceutiche e Biologiche**: (2003), 142, (5), 206-210.
5. J. Cieplik, J. Pluta, O. Gubrynowicz: “*Synthesis and bacterial properties of 4-sulfonamidopyrimidine derivatives*”, **Acta Poloniae Pharmaceutica**, (2003) 60, (1), 75-79.
6. J. Cieplik: „*Synthesis of pyrimido[4,5-d]pyrimidinesulfon derivatives*” **ANNALES** (2003), LVIII **8**, AA, 112-117.
7. J. Cieplik: „*Synthesis of pyrimido[4,5-d]pyrimidine derivatives*” **ANNALES** (2003), LVIII **7**, AA, 105-111.
8. J. Cieplik, J. Pluta, O. Gubrynowicz: „*Synthesis of pyrimidopyrimidinesulfon derivatives*”, **SCIENTIA PHARMACEUTICA Osterreichische Pharmazeutische Gesellschaft** (2002), **79**, (3), 245-252.
9. **J. Cieplik, J. Pluta, O. Gubrynowicz**: “*Synthesis and bacterial activity of 3-alkyl derivatives of some pyrimido[4,5-d]pyrimidine*”, **ACTA POLONIAE PHARMACEUTICA**: (2004), **61**, (1), 487-492.

Adres do korespondencji:

Dr hab. Jerzy Cieplik, prof A.M.

Katedra i Zakład Chemii Organicznej

50-137 Wrocław

ul. Grodzka 9

Współczesne problemy flebologii – Przewlekła Choroba Żylna

Dominik Kołodziej, Mirosław Polok, Urszula Oleśków, Dorota Jabłecka, Dominika Grigier

Katedra i Zakład Toksykologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Kierownik placówki: Prof. dr hab. Jerzy Kwapuliński

Streszczenie

Przewlekła choroba żylna, będąca stanem niewydolności krążenia żylnego staje się z roku na rok coraz większym problemem mogącym dotykać w krajach rozwiniętych do 40% populacji. Przyczyną PCHŻ jest upośledzenie drożności żył, niewydolność zastawek lub oba te mechanizmy łącznie. Najważniejszą metodą diagnostyczną PCHŻ stosowaną w Polsce i na świecie jest ultrasonografia dopplerowska. Leczenie zachowawcze polega na zminimalizowaniu czynników ryzyka, terapii uciskowej i stosowaniu leków flebotropowych. Leczenie chirurgiczne obejmuje leczenie operacyjne.

Słowa kluczowe: przewlekła choroba żylna, leki flebotropowe, żylaki

Summary

Chronic venous disease, which is a state of venous insufficiency, is becoming a more severe problem by the year; it may affect up to 40 % of the population in the developed countries. The reason of CVD is the venous patency impairment, venous insufficiency or both of these mechanisms. The main diagnostic method for CVD, used worldwide (also in Poland), is Doppler ultrasonography. Conservative therapy includes reducing risk factors, compression therapy and application of phlebotropic drugs. Surgical treatment involves an operation.

Key words: chronic venous disease (CVD), phlebotropic drugs, varicose veins

Przewlekła choroba żylna (Chronic Venous Disease – CVD) jest stanem niewydolności krążenia żylnego w następstwie częściowego upośledzenia drożności żył lub zaburzenia funkcji zastawek żylnych. CVD należy odróżnić od niewydolności żylniej, która jest stanem charakteryzującym się zaburzonym odpływem i nadciśnieniem żylnym u pacjenta w pozycji stojącej, który to stan jest wtórny do zmian obstrukcyjnych w żyłach, ich poszerzenia lub zaburzenia funkcji. Niewydolność żylna dotyczy naczyń żylnych jako takich, podczas gdy przewlekła choroba żylna dotyczy także skóry, tkanki podskórnej i mięśni. Niewydolność żylna powoduje nadciśnienie żyłne, które w konsekwencji prowadzi do przewlekłej choroby żylniej.

Z powodu trudności w porównaniu wyników poszczególnych badań epidemiologicznych, wynikających z różnych kryteriów klasyfikacji pacjentów, częstość występowania przewlekłej choroby żylniej nie została do końca poznana. Mimo to szacuje się iż CVD występuje średnio u 1-40 % kobiet i 1-17 % mężczyzn na świecie. Stwierdzono istotną zależność występowania CVD od rejonu geograficznego, gdzie najwyższą zapadalność notuje się w krajach rozwiniętych, co potwierdza związek między trybem życia ludzi a chorobami żył.

Przyczyną przewlekłej choroby żylniej jest nadciśnienie żyłne, będące efektem niewydolności zastawek, niedrożności żył lub obu tych zjawisk łącznie. Pierwotna niewydolność zastawek jest związana z czynnikami genetycznymi i wrodzonymi, wiekiem, charakterem pracy, w wyniku czego dochodzi do postępujących zmian w zastawkach. Wtórna niewydolność zastawek jest najczęściej spowodowana procesem rekanalizacji po przebytej zakrzepicy żył głębokich. Przyczyną niewydolności zastawek może być również dysfunkcja mięśni zaburzenie czynności pompy mięśniowej w przebiegu pierwotnych lub wtórnych dystrofii mięśniowych. Pierwotna niedrożność żył jest efektem wrodzonych anomalii – braku żył (aplazji), niedorozwoju (hipoplazji) lub nieprawidłowego rozwoju (angiodyplazji), ucisku z zewnątrz przez pasma łącznotkankowe, obturacji częściowej lub całkowitej światła naczyń przez przetrwałe struktury błoniaste. Powodem wtórnej niedrożności żył jest niepełna rekanalizacja po przebytych procesach zakrzepowym, ucisku żył z zewnątrz (np. przez guz nowotworowy). Zmiany te powodują zwiększenie ciśnienia w układzie żylnym głębokim i w następstwie wtórna niewydolność żył łączących oraz nadciśnienie w układzie żył powierzchownych. Szczególnie widoczne jest to w okolicy dystalnych żył przesywają-

cych, łączących układ głęboki i powierzchowny w rejonie kostki przyśrodkowej, gdzie obserwuje się największe nasilenie zmian skórnych w przebiegu CVD. W następstwie powyższych zmian zachodzących w makrokrążeniu dochodzi do zaburzeń w mikrokrążeniu i aktywacji mechanizmów powodujących uszkodzenie tkanek. Na skutek zmian hemodynamicznych we włosniczkach dochodzi początkowo do „rulonizacji” leukocytów, a następnie do ich adhezji do ścian śródbłonna i uwolnienia cytokin oraz enzymów proteolitycznych. Prowadzi to do uszkodzenia śródbłonna, czego konsekwencją jest destrukcja tkanki okołonaczyniowej. Zjawisko to zwane jest pułapką leukocytarną. Teoria ta tłumaczy powstawanie owrzodzenia żylnego w zaawansowanej postaci CVD i uzupełnia tzw. teorię mankietu fibrynowego – wskutek wzmożonej przepuszczalności włosniczek elementy morfotyczne krwi, woda i białka osocza przedostają się do tkanek. Fibrynogen powoduje tworzenie mankiętów fibrynowych wokół naczyń, które to mankiety utrudniają wymianę tlenu i prowadzą do uszkodzenia tkanek. Niedotlenienie prowadzi do otwarcia przetok tętniczo-żylnych w skórze, co pogłębia jeszcze ten proces. Obrzęk kończyny w przebiegu CVD tłumaczy się zwiększeniem ciśnienia hydrostatycznego w części żylnego mikrokrążenia, uszkodzeniem naczyń chłonnych w przebiegu zapaleń skóry i tkanki podskórnej oraz przechodzeniem molekuł białka poprzez uszkodzone naczynia włosowate, co prowadzi do wtórnej ucieczki wody do przestrzeni międzykomórkowej.

Istnieje kilka klasyfikacji przewlekłej choroby żylnego, jednakże najbardziej rozpowszechnioną jest klasyfikacja CEAP (clinical, etiologic, anatomic, pathophysiological), obejmująca aspekty kliniczne, etiologiczne, anatomiczne i patofizjologiczne CVD. Powstała ona podczas VI Międzynarodowego Kongresu Ekspertów, który odbył się na Hawajach w 1994 roku. Klasyfikacja ta jest oparta na uzupełnionych i powtórnie opracowanych danych z publikacji Reporting Standards In Venous Disease.

Klasyfikacja CEAP

Cecha C (klasyfikacja kliniczna):

- C₀ Brak widocznych lub wyczuwalnych palpacyjnie zmian żylakowych,
- C₁ Obecność teleangiektazji lub żylaków siatkowatych,
- C₂ Żyłaki,
- C₃ Obrzęk,
- C₄ Zmiany skórne pochodzenia żylnego: przebarwienia, wypryski pochodzenia żylnego, zapalenie tkanki podskórnej,
- C₅ Zmiany skórne jak w stopniu C₄ z blizną powrzodową,
- C₆ Zmiany skórne jak w stopniu C₄ z niezabliźnionym owrzodzeniem.

Cecha E (klasyfikacja etiologiczna):

- E_c Zmiany wrodzone,
- E_p Zmiany pierwotne, a więc o nieznanym przyczynie,
- E_s Zmiany wtórne o znanej przyczynie:
 - pozakrzepowe,
 - pourazowe,
 - inne.

Cecha A (klasyfikacja anatomiczna):

A_s Układ żylny powierzchowny:

- 1 Teleangiektazje, żyłaki siatkowate,
- 2 Żyła odpiszczelowa powyżej kolana,
- 3 Żyła odpiszczelowa poniżej kolana,
- 4 Żyła odstrzałkowa,
- 5 Zmiany w obrębie żył spoza układu żył odpiszczelowej i odstrzałkowej.

A_D Układ żylny głęboki:

- 6 Żyła główna dolna,
- 7 Żyła biodrowa wspólna,
- 8 Żyła biodrowa wewnętrzna,
- 9 Żyła biodrowa zewnętrzna,
- 10 Żyły miednicy: okolice narządów płciowych, więzadła szerokiego itp.
- 11 Żyła udowa wspólna,
- 12 Żyła udowa głęboka,
- 13 Żyła udowa (powierzchnowa),
- 14 Żyła podkolanowa,
- 15 Żyły łydki (łydki): piszczelowe przednie i tylne, strzałkowe,
- 16 Żyły mięśni szkieletowych: brzuchatego łydki, płaszczowatego, inne.

A_p Żyły przeszzywające:

- 17 Uda,
- 18 Goleni.

Cecha P (klasyfikacja fizjopatologiczna):

- P_R Refluks,
- P_O Niedrożność,
- P_{RO} Współistnienie obu mechanizmów.

Do czynników ryzyka CVD należy zaliczyć:

- wiek – jest głównym czynnikiem ryzyka. W rozwoju osobniczym częstość występowania żylaków w układzie żył odpiszczelowej lub odstrzałkowej oraz częstość występowania teleangiektazji i żylaków siatkowatych rośnie proporcjonalnie do wieku. W związku z tym w populacji 70-latków żyłaki lub teleangiektazje występują u około 70% mężczyzn i kobiet.
- czynniki dziedziczne – występowanie zmian żylakowych często ma charakter rodzinny. Wywiad rodzinny u pacjentów z żylakami jest 2-krotnie częściej obciążony niż u osób, u których żylaków się nie stwierdza. Do tej pory nie udało się zidentyfikować genu i sposobu dziedziczenia CVD. Przypuszcza się iż przyczyną mogą być zmiany strukturalne macierzy pozakomórkowej ściany żyły lub jej zastawek – stosunek kolagenu do elastyny lub zaburzenia elementów komórkowych ściany żył.
- płeć – w większości badań epidemiologicznych wykazano większą częstość występowania żylaków u kobiet.
- ciąża – przyczyną jest działanie głównie progesteronu na ściany żył, a także wzrost objętości krwi krążącej w układzie żylnym oraz zmiany w układzie krzepnięcia krwi. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy liczbą ciąż a ryzykiem CVD.

- praca w pozycji stojącej lub siedzącej – niepracująca pompa mięśniowa oraz utrudniony odpływ krwi do serca przyczynia się do rozwoju CVD.
- otyłość – zwiększona masa ciała przy jednocześnie większej predyspozycji do zapaleń tkanki podskórnej wpływa na rozwój CVD.
- zaburzenia w układzie krzepnięcia krwi, niedobór białek układu krzepnięcia, nowotwory (najczęstszą przyczyną uszkodzenia żyły jest wystąpienie skrzepu i proces rekanalizacji żyły, powodujący zniszczenie nie tylko ściany żyły, ale także jej zastawek).
- niektóre leki – np. doustne leki antykoncepcyjne.
- przewlekłe zaparcia – spożywanie pokarmów z małą zawartością błonnika zwiększa również ryzyko powstawania żylaków. Podwyższone ciśnienie wewnątrz jamy brzusznej w trakcie defekacji przenosi się przez żyły biodrowe na żyły kończyn dolnych, powodując stopniowe uszkodzenie ich zastawek.

Oprócz wymienionych powyżej czynników na zwiększone ryzyko CVD wpływają również: cukrzyca, miażdżycza tętnic kończyn dolnych, nadmierna wiotkość aparatu więzadłowego, duże zabiegi operacyjne, długie unieruchomienie, leczenie przeciwnowotworowe, choroba zakrzepowo-zatorowa, niewydolność serca III i IV klasy oraz niewydolność oddechowa.

Objawy podmiotowe przewlekłej choroby żyłnej nie są dla niej swoiste. Zgłaszają je osoby z chorobą żylną wszystkich stopni, od objawowego stopnia C₀ do stopnia C₆ (czynne owrzodzenie). Zawsze należy ustalić naturę, rodzaj i czas każdego ze zgłaszanych objawów, a następnie rozważyć je i poszukiwać innej możliwej przyczyny dolegliwości. Do najczęstszych objawów podmiotowych CVD należą: ból (bolesność w rzucie żylaka lub zmienionego naczynia w przebiegu zakrzepowego zapalenia żył powierzchownych, rozlany ból dystalnych części kończyn dolnych, żyłne chromanie przestankowe), uczucie ciężkości nóg (w wielu przypadkach u kobiet ma charakter cykliczny – faza przedmiesiączkowa), świąd, nocne kurcze mięśni i zespół niespokojnych nóg.

Do objawów przedmiotowych CVD należą:

- poszerzenia żyłne – występują najwcześniej, początkowo jako teleangiektazje (poszerzenia żyłek skórnych o średnicy do 1 mm), później żyły siatkowate (poszerzenia żyłek skórnych o średnicy do 4 mm). Często traktowane jedynie jako problem kosmetyczny, jednakże u 30% pacjentów z teleangiektazjami stwierdza się już uszkodzenie zastawek żylnych.
- żylaki – stanowią najczęstszą manifestację kliniczną przewlekłej choroby żyłnej. Można je podzielić na pierwotne i wtórne. Pierwotne są spowodowane nieprawidłowościami w układzie powierzchownym – wrodzoną skłonnością do nieprawidłowej funkcji zastawek oraz osłabieniem ściany żyłnej. Żylaki wtórne występują w następstwie niewydolności żył głębokich, przeszywających lub wskutek istnienia przetok tętniczo-żylnych. Wyróżniamy następujące typy żylaków:

- żylaki spoza układu żyły odpiszczelowej i odstrzałkowej:
 - żylaki siatkowate,
 - żylaki sromu,
 - żylaki krocza.
- żylaki układu żyły odpiszczelowej i odstrzałkowej:
 - żylaki pni głównych – pnia żyły odpiszczelowej i odstrzałkowej,
 - żylaki pni dodatkowych (lub naczyń pobocznych układu żyły odpiszczelowej i odstrzałkowej).
- obrzęk kończyny,
- przebarwienia wskutek odkładania się hemosyderyny w skórze i tkance podskórnej,
- zapalenia wypryskowe,
- stwardnienia tłuszczowo-skórne,
- blizny ze zmniejszoną pigmentacją skóry (atrofie blanche),
- wygojone lub czynne owrzodzenia żyłne,
- włóknienie i zaciąganie skóry właściwej,
- usztywnienie stawów skokowych wskutek zmian destrukcyjnych skóry, tkanki podskórnej, ścięgien oraz zaburzeń pompy mięśniowej,
- brzęk limfatyczny i brodawczakowatość skóry na skutek zaburzeń ze strony naczyń limfatycznych.

Diagnostyka przewlekłej choroby żyłnej obejmuje: wywiad z pacjentem, badanie przedmiotowe, a często także badania dodatkowe (najczęściej ultrasonografię dopplerowską).

1. Wywiad – usystematyzowany wywiad umożliwi określenie znaczenia poszczególnych objawów, ocenę różnych czynników ryzyka chorób żył i ustalenie rokowania. Podczas przeprowadzania wywiadu u chorych z podejrzeniem CVD należy ocenić czynniki ryzyka tej choroby, zwrócić uwagę na zgłaszane dolegliwości, ich korelację z czasem (nasilenie w godzinach popołudniowych, zmniejszenie dolegliwości podczas spoczynku nocnego), temperaturą otoczenia oraz wysiłkiem fizycznym. Istotne jest występowanie chorób żył w wywiadzie, zarówno u pacjenta, jak i w jego rodzinie, rodzaj ich leczenia farmakologicznego czy też operacyjnego. Należy również zebrać szczegółowy wywiad w kierunku: chorób tętnic, schorzeń neurologicznych a także schorzeń stawów i struktur pozastawowych.
2. Badanie przedmiotowe – powinno być przeprowadzone dwuetapowo – w pozycji leżącej oraz w pozycji stojącej. Podczas badania w pozycji leżącej ocenia się: zmiany skórne, obrzęk (charakter obrzęku – miękki obrzęk, po ucisku powstaje dołek, zmiany stwardniałe, wielkość obrzęku – obwody kończyn oraz umiejscowienie zmian), symetrię kończyn, zaburzenia statyki (obecność modzeli, palców młoteczkowatych, koślawych paluchów, obniżenie łuku stopy i ruchomość stawów) oraz niewydolność tętnic. W pozycji stojącej widoczne jest napięcie ścian powierzchownego układu żylnego, a żylaki są lepiej widoczne i bardziej dostępne w badaniu palpacyjnym. Podczas badania pacjent powinien znajdować się na podnóżku flebologicznym, opierając ciężar ciała najpierw na jednej, potem na drugiej nodze, co umożliwia rozluźnienie badanej kończyny.

Postęp w dziedzinie nieinwazyjnej diagnostyki czynnościowej spowodował zmniejszenie znaczenia prób klinicznych, niemniej jednak nadal są one szybką i tanią pomocą diagnostyczną. Do stosowanych prób flebologicznych należą:

- objaw fali (próba Schwartz) – pozwala wykryć uszkodzenie zastawek żył powierzchownych oraz wzajemne zależności między dwoma lub więcej żyłakami. Pacjent stoi wyprostowany. Badający opukuje palcami żyłę wzdłuż jej przebiegu lub najbliższy żyłak. Obecność fali wstrząsowej potwierdza istnienie refluksu żylnego.
- próba kaszlowa – kaszel wywołuje nagły wzrost ciśnienia wewnątrzbrzusznego. Ucisk żyły głównej dolnej powoduje refluks, który można wyczuć, dotykając ujścia żyły odpiszczelowej lub żyłaka.
- próba Trendelenburga – pozwala na ujawnienie niewydolności ujścia żyły odpiszczelowej. Pacjentowi leżącemu na plecach zakłada się opaskę elastyczną wokół górnej części uda, a następnie chory wstaje. Jeżeli niewydolne są żyły przeszywające, żyłki nie wypełniają się, zanim nie zostanie zdjęta opaska. Jeżeli niewydolne jest ujście żyły odpiszczelowej, po zdjęciu opaski elastycznej dochodzi do nagłego rozszerzenia tej żyły.
- próba Perthesa – za jej pomocą można potwierdzić drożność układu głębokiego oraz wydolność żył przeszywających. Pacjent stoi, a opaskę elastyczną zakłada się poniżej kolana. Po wykonaniu ćwiczeń (chodzenie, zgięcia kolan) żyłki opróżniają się, jeżeli układ głęboki jest drożny, a żyły przeszywające są wydolne.

3. Badania dodatkowe – w razie wątpliwości diagnostycznych kolejnym etapem postępowania są badania ultradźwiękowe. Badanie tzw. Ślepym Dopplerem traktowane jest jako test przesiewowy w wykrywaniu niewydolnych połączeń piszczelowo-udowych. Ultrasonografia techniką podwójnego obrazowania (duplex) charakteryzuje się wysoką czułością dla refluksu żył głębokich, uwidacznienia odcinki niedrożne oraz w dobrym stopniu umożliwia lokalizację zmian podskórnych. W doświadczonych rękach stanowi najważniejsze narzędzie diagnostyczne we flebologii. Flebografia wstępująca i zstępująca stanowią nadal złoty standard oceny patologii układu żylnego. Pozwalają dokładnie zobrazować niedrożności oraz ocenić refluks głęboki. Jednak ze względu na inwazyjność, możliwość odczynów uczuleniowych oraz koszt badania flebografia powinna być wykonywana jedynie w trudnych diagnostycznie przypadkach w oddziałach angiochirurgicznych. Zastosowanie pletyzmografii oraz fotopletyzmografii ograniczone jest do specjalistycznych ośrodków klinicznych, według raportu VEINES metody te cechuje niska czułość i specyficzność oraz mała wartość diagnostyczna w wykrywaniu refluksu żylnego. Należy podkreślić wzajemne uzupełnianie się metod diagnostycznych oraz ich dostępność w przypadku praktyki lekarza rodzinnego. Obok dokładnie przeprowadzonego badania fizykalnego powszechnie dostępnym i wiarygodnym badaniem wydają się być badania dopplerowskie.

Istnieją cztery podstawowe metody leczenia przewlekłych zaburzeń żylnych kończyn dolnych: farmakoterapia, kompresoterapia, skleroterapia i leczenie operacyjne.

W farmakoterapii zastosowanie znajdują leki poprawiające napięcie ściany żyłnej oraz przeciwdziałające skutkom zaburzeń w mikrokrążeniu i zastojowi limfatycznemu, zawsze towarzyszących patologii żyłnej. Wielu autorów podkreśla znaczenie połączenia diosminy i hesperydyny w ułatwiającej wchłanianie mikronizowanej formie. Do najważniejszych produktów naturalnych należą substancje zawierające jako czynnik aktywny rutynę, troxerutynę oraz escynę. Do najważniejszych produktów syntetycznych zaliczamy tribenozyd, heptaminol, hefteron i dobesylian wapniowy. Kolejną grupę tworzą leki reologicznie czynne, jak pentoksyfilinga oraz dekstrany. W wielu przypadkach zachodzi konieczność stosowania leków przeciwzakrzepowych jak antagoniści witaminy K (np. acenokumarol), heparyna klasyczna lub heparyny drobnocząsteczkowe.

Terapia uciskowa (kompresoterapia) poprzez zmniejszenie średnicy naczynia żylnego i przepuszczalności włóścinkowej ułatwia powrót żylny. Przeciwdziałając obrzękowi oraz zastojowi limfatycznemu działanie swoje kieruje na główne, zgłaszane przez chorych dolegliwości. Zastosowanie znajdują tu zarówno elastyczne, jak i nieelastyczne bandaże oraz różne rodzaje pończoch i rajstop uciskowych. Idealnym jest stopniowanie kompresji (ucisk określany jest w stopniach od 0 do III). Jest jedną z najtańszych oraz wysoce skutecznych metod leczenia, na skutek braku informacji zbyt rzadko dotychczas stosowana w polskich warunkach.

Skleroterapia za zadanie stawia sobie likwidację żyłaków poprzez śródnaczyniowe iniekcje chemicznych środków obliterujących. Rozpoczęcie reakcji fibrynolitycznej w obrębie naczynia żylnego wywoływać ma jego zarosnięcie. Stosowana bywa głównie w przypadkach teleangiektazji oraz żył siateczkowatych, często jej wyniki są wyłącznie kosmetyczne i czasowe. Ilość powikłań jest wysoce zależna od rodzaju i stężenia środka chemicznego oraz doświadczenia wykonującego zabieg. Zalecana jest również w leczeniu żyłaków bocznych gałęzi żyły odpiszczelowej oraz żyłaków nawrotowych po leczeniu chirurgicznym.

Leczenie operacyjne CVD wiąże się z istotną poprawą jakości życia i oceny stanu zdrowia przez chorych. Uzupełnienie terapii kompresyjnej oraz farmakologicznej zabiegami chirurgicznymi znacznie zmniejsza odsetek nawrotów przewlekłych owrzodzeń żylnych. Możliwości leczenia żyłaków kończyn dolnych to:

- wysokie podwiązanie żyły odpiszczelowej,
- usunięcie (stripping) żyły odpiszczelowej – zarówno wysokie podwiązania, jak i usunięcie żyły odpiszczelowej mogą być powikłane zakażeniem, martwicą skóry, powstaniem krwiaka, chłonetokiem lub powstaniem zbiornika chłonki
- usunięcie żyły z drobnych cięć – efekt kosmetyczny tej operacji jest dobry. Wśród powikłań opisywano pęcherze skórne, martwicę skóry, miejscowe zaburzenia czucia, krwiaki, przebarwienia skóry,
- selektywne podwiązanie niewydolnych żył przeszywających,
- endoskopowe lub otwarte podpowięziowe przecięcie żył przeszywających,

- kriochirurgia żyłaków,
- naprawa zastawek żylnych,
- przeszczep odcinka żyły,
- zakładanie opaski na żyły z niewydolnymi zastawkami (banding).

Postępy chirurgii naczyniowej, systematyczne pogłębianie wiedzy i umiejętności praktycznych oraz współpraca pomiędzy lekarzami różnych specjalności pozwalają skutecznie leczyć chorych z CVD, zapobiegają inwalidztwu, redukują liczbę hospitalizacji, a tym samym przedłużają życie chorym i zwiększają jego komfort.

Piśmiennictwo:

1. Ramelet A-A, Kern P, Perrin M, : Żyłaki I teleangiektazje 2004.
2. Zubilewicz T, Wroński J, Michalak J, : Medycyna Rodzinna 2/2002; 96-100.
3. Liwień M, : Przewlekła choroba żylna; Przew Lek 2006; 5: 70-79.
4. Coleridge-Smith PD, Mikrokrążenie w chorobach żył; 2000.
5. Becker F, Patologia układu żylnego 2006.
6. Noszczyk W, Chirurgia tętnic i żył obwodowych 1998.
7. Ziąja K, Poradnik leczenia chorób żył 1996.
8. Żmudzińska M, Czarnecka-Operacz M, Przewlekła niewydolność żylna – aktualny stan wiedzy; PDiA 2005; XXII, 2: 65–69.
9. Chęciński P, Choroby naczyń wybrane problemy 2008.

Adres do korespondencji:
mgr farm. Dominik Kołodziej
ul. Augustynika 17/19
41-300 Dąbrowa Górnicza
e-mail: chemik81@interia.pl

Zmiany w aktywności kinazy kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDH) w wątrobach szczurów pod wpływem wysokiej i niskiej dawki kwasu kawowego (cz.I).*

Effect of high and low dose of Caffeic Acid on liver pyruvate dehydrogenase kinase activity in rats (part I).

Małgorzata Tyszka-Czochara¹, Joanna Gdula-Argasińska¹, Beata Surmacz¹, Jerzy Jaśkiewicz²

¹ Zakład Analityki Biochemicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul Medyczna 9, 30-688 Kraków

² Kierownik Zakładu Analityki Biochemicznej

Streszczenie

Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDH) jest regulatorowym enzymem przemiany węglowodanów i lipidów. PDH warunkuje ukierunkowanie określonych torów metabolicznych w stanie sytości, w okresach między posiłkowych i stanie głodu. Aktywność PDH podlega precyzyjnej regulacji działaniem specyficznej kinazy kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDK) oraz działaniem fosfatazy (PDP).

Kwas kawowy (kwas 3,4-dihydroksycynamonowy) to związek chemiczny pochodzenia roślinnego, należący do grupy kwasów fenolowych. Zwyczajowo ten kwas fenolowy zaliczany jest do grupy polifenoli. Związki polifenolowe stanowią znaczący składnik diety człowieka. Powszechnie znane są właściwości antyoksydacyjne tych związków. Wykazano hamujący wpływ kwasu kawowego na rozwój reakcji alergicznej. Potwierdzono działanie ochronne przed nowotworzeniem na komórki organizmu, chociaż całkowicie nie poznano mechanizmu tych procesów. Badano hepatoprotekcyjnie oddziaływanie kwasu kawowego, który zapobiegał uszkodzeniom wywołanych działaniem innych ksenobiotyków. Stwierdzono także działanie przeciwbakteryjne oraz przeciwwirusowe tego kwasu.

Nieliczne prace poświęcono badaniu oddziaływania polifenoli, w tym kwasu kawowego, na gospodarkę węglowodanową organizmów ssaków. Szczególnie interesujące jest określenie wpływu związków polifenolowych na kierunek przebiegu torów metabolicznych. Nie badano wpływu polifenoli na aktywność PDH oraz kinazy kompleksu PDH *in vivo*.

Słowa kluczowe: Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDH), Kinaza kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDK), kwas kawowy, polifenole, gospodarka węglowodanowa i lipidowa organizmu

Abstract

Pyruvate dehydrogenase complex (PDH) catalyses the oxidative decarboxylation of pyruvate to acetylCo-A. PDH plays an important role in carbohydrate and lipid metabolism. Mammalian PDH complex is precisely regulated by specific PDH kinase (PDK) and PDH phosphatase (PDP).

Caffeic Acid (3,4-dihydroxy cinnamate acid) is a polyphenolic compound ubiquitous in plants and also in human diet. Several studies have shown that this phenolic acid is an effective antioxidant and may contribute to the prevention of diseases associated with oxidative stress. Anticancer, hepatoprotective and antibacterial activity of Caffeic Acid have been reported.

It was established that PDK activity is modified by the various groups of xenobiotics. It is probable that polyphenols may improve carbohydrate and lipid metabolism. However, precise molecular action of these compounds is still unclear. It is of interest to find out if Caffeic Acid change PDK activity *in vivo*.

Key words: Pyruvate Dehydrogenase Complex (PDH), Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDK), Caffeic Acid, Polyphenols, Carbohydrate and Lipid Metabolism

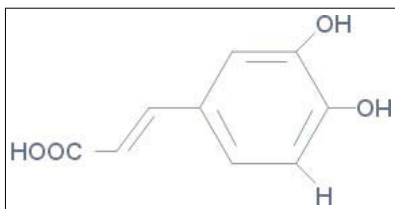
* Praca finansowana z projektu badawczego KBN nr 2P05D 059 28

1. Wstęp

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie suplementami diety pochodzenia roślinnego. Jednak wiedza o oddziaływaniu substancji biologicznie czynnych zawartych w ekstraktach roślinnych na organizm człowieka jest jeszcze niepełna. Ze względu na rosnące zainteresowanie produktami roślinnymi oraz wzbogacanie diety o różnorodne ekstrakty roślinne, niezbędne jest precyzyjne zbadanie wpływu związków aktywnych na organizm człowieka i określenie mechanizmów oddziaływania tych związków. Wstępnych informacji w tym zakresie dostarczyły wyniki badań epidemiologicznych. Stwierdzono, że w populacji mieszkańców Morza Śródziemnego regularne umiarkowane spożywanie czerwonego wina bogatego w związki polifenolowe działa protekcyjne w chorobie niedokrwiennej serca i w innych chorobach naczyniowych nawet przy dużym spożyciu nasyconych kwasów tłuszczowych z dietą. Zjawisko to nazwano „francuskim paradoksem” [1]. Kolejne obserwacje wykazały, że mieszkańcy Sardynii, przy stosunkowo wysokiej zawartości kwasów tłuszczowych nasyconych w diecie, rzadziej chorują na choroby cywilizacyjne, a długość ich życia jest wyższa niż przeciętnego Europejczyka [2]. Jednocześnie należy podkreślić, że na tych terenach spożycie czerwonego wina oraz warzyw i owoców jest większe, niż na pozostałych obszarach Europy. Wykazano, że czynnikami powodującymi dobroczynne działanie są zawarte w diecie śródziemnomorskiej polifenole [3,4]. W wyniku dalszych badań, w wielu populacjach ludzkich potwierdzono, że spożywanie diety bogatej w polifenole, na przykład herbaty lub wina, dużej ilości warzyw i owoców, wpływa pozytywnie na stan zdrowia oraz długość życia ludzi. Taką zależność zanotowano szczególnie w populacji mieszkańców wyspy Okinawa w Japonii [5].

2. Kwas kawowy

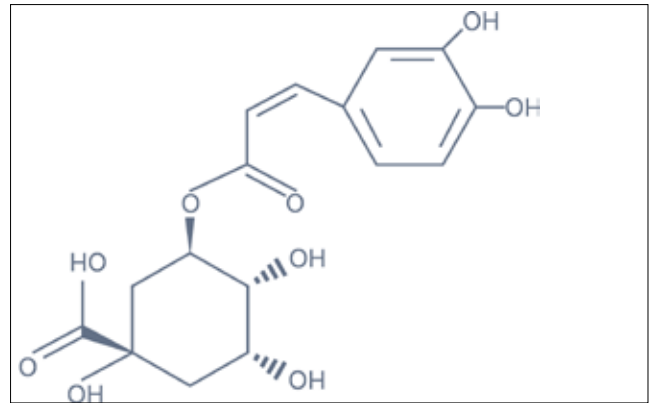
Kwas kawowy (kwas 3,4-dihydroksycynamonowy) to związek chemiczny pochodzenia roślinnego, należący do grupy kwasów fenolowych. Kwas kawowy jest pochodną kwasu cynamonowego. Cząsteczka kwasu kawowego składa się z jednego pierścienia fenyloвого połączonego poprzez resztę allilową z grupą karboksylową. Z pierścieniem w pozycji 3 i 4 połączone są dwie grupy hydroksylowe (rycina 1) [6,7].



Rycina 1. Schemat struktury kwasu kawowego [6,7]

Głównym źródłem kwasu kawowego w diecie człowieka są napoje takie jak kawa i czerwone wino. Ponadto w pożywieniu kwas kawowy występuje w owocach, takich jak jabłka, gruszki,

jagody, brzoskwinie oraz warzywach (bakłażany, karczochy). Źródłem kwasu kawowego jest również propolis [8,9]. Pożywienie ludzi zamieszkujących poszczególne regiony świata jest odmienne pod względem zawartości kwasu kawowego. Na zróżnicowanie diety wpływają względy kul-



Rycina 2 Schemat struktury kwasu chlorogenowego [6,7]

turów lub środowiskowe. W produktach roślinnych kwas kawowy może występować w postaci wolnej lub jako ester z kwasem chinowym, czyli jako kwas chlorogenowy (rycina 2). Dzielne spożycie kawy dostarcza około 0,5-1g kwasu chlorogenowego [9,10]. W czerwonym winie kwas kawowy występuje w postaci wolnej, a przeciętna zawartość tego związku wynosi kilka mg/l [11].

2.1 METABOLIZM KWASU KAWOWEGO W ORGANIZMIE

Procesy wchłaniania kwasu chlorogenowego oraz wolnego kwasu kawowego prawdopodobnie przebiegają w odmienny sposób. Wykazano, że w organizmie ludzkim tylko około 30% kwasu chlorogenowego wprowadzonego z posiłkiem ulega wchłanianiu, natomiast dla wolnego kwasu kawowego efektywność wchłaniania jest wysoka i wynosi około 95% [12]. Mechanizmy wchłaniania kwasu chlorogenowego i wolnego kwasu kawowego oraz miejsca absorpcji tych związków w przewodzie pokarmowym nie zostały jeszcze do końca poznane. Wiadomo jednak, że stopień wchłaniania związków polifenolowych uzależniony jest od rodzaju, właściwości chemicznych i fizycznych związków polifenolowych oraz od obecności i rodzaju grup funkcyjnych [13].

Wykazano, że cząsteczka kwasu chlorogenowego częściowo ulega hydrolizie do kwasu chinowego i kwasu kawowego w żołądku i w jelicie cienkim, a następnie każdy z tych związków ulega odmiennym procesom absorpcji. Cząsteczki kwasu kawowego wchłaniane są poprzez transport bierny już w żołądku przez komórki okładzinowe [14,15]. Proces ten zależny jest od niskiego pH soku żołądkowego. Ponadto kwas kawowy ulega wchłanianiu w jelicie czczym. W warunkach podwyższonego pH wchłanianie kwasu kawowego przez rąbek szczoteczki komórek nabłonkowych jelita odbywa się na zasadzie transportu aktywnego zależnego od jonów Na^+ [16]. Obydwa mechanizmy wchłaniania zbadano u gryzoni, prawdopodobnie u ludzi procesy te przebiegają podobnie. W enterocytach, komórkach jelita cienkiego, kwas 3,4-dihydroksycynamonowy podlega glukuronizacji działaniem enzymu UDP-glukuronylotransferazy. [10]. Dodatkowo, w pewnym zakresie, kwas chlorogenowy może być transportowany do wnętrza kolonocytów w górnym odcinku jelita grubego [12].

Istotną rolę w absorpcji oraz w metabolizmie kwasu chlorogenowego i kwasu kawowego pełni flora jelita gru-

bego [17]. W badaniach prowadzonych u ludzi wykazano, iż część kwasu chlorogenowego, która nie uległa hydrolizie w początkowym odcinku przewodu pokarmowego zostaje poddana działaniu esteraz bakterii mikroflory jelita grubego. Bakterie hydrolizując kwas chlorogenowy umożliwiają proces wchłaniania kwasu kawowego do krwioobiegu. Wykazano, że głównymi metabolitami zaabsorbowanego i przekształconego przez mikroflorę jelitową kwasu kawowego są kwas m-kumarynowy, kwas m-hydroksyfenylopropionowy (mHPP) oraz kwas 3,4-dihydroksyfenylopropionowy (DHPP). Stwierdzono także, że bakterie mikroflory jelita grubego mogą przeprowadzać reakcję metylacji kwasu kawowego do kwasu ferulowego i izoferulowego [18].

Po przejściu do krwioobiegu kwas kawowy zarówno w formie wolnej jak i związanej z kwasem glukuronowym transportowany jest z krwią żyły wrotnej do wątroby. Wykazano, że u człowieka kwas ferulowy, kwas izoferulowy oraz kwas dihydroferulowy mogą stanowić wykładniki biodostępności i metabolizmu estrów kwasu kawowego. W krwioobiegu kwas kawowy w formie wolnej transportowany jest w postaci kompleksów z albuminami osocza krwi [19]. Podczas pierwszego przejścia przez wątrobę kwas kawowy ulega metylacji. Reakcja ta katalizowana jest przez katecholo-O-metylotransferazę (COMT), a produktami reakcji są kwas ferulowy i kwas izoferulowy [10,20]. Prawdopodobnie kwas kawowy może również ulegać w wątrobie redukcji do kwasu dihydrokawowego. Ponieważ kwas ferulowy powstaje z kwasu kawowego przy udziale COMT, można przypuszczać, że analogicznie substratem reakcji katalizowanej przez metylotransferazę może być kwas dihydrokawowy, który następnie ulega przemianie do kwasu dihydroferulowego [18]. Kwas ferulowy i izoferulowy ulegają w wątrobie sprzęganiu z kwasem glukuronowym. Reakcja ta jest katalizowana przez UDP-glukuronylotransferazę. W następstwie glukuronidacji powstają związki chemiczne o nowych właściwościach biologicznych, m.in. właściwościach antyoksydacyjnych [21]. Prawdopodobnie kwas izoferulowy może ulegać dalszym przemianom, czyli redukcji do kwasu dihydroferulowego, który z kolei ulega przekształceniu do kwasu wanilinowego. W badaniach farmakokinetycznych przeprowadzonych u ludzi, zaobserwowano po spożyciu kawy wzrost stężenia kwasu wanilinowego w osoczu krwi [22]. Kwas izoferulowy jest unikalnym markerem, ponieważ nie występuje w diecie człowieka, natomiast prekursorami kwasu dihydroferulowego mogą być określone flawonoidy [23].

Wykazano, że kwas kawowy oraz metabolity tego związku transportowane są z hepatocytów do krwioobiegu. Stwierdzono, że maksymalne stężenie kwasu kawowego, kwasu ferulowego i kwasu izoferulowego we krwi u ludzi pojawia się po około 1 godzinie od spożycia posiłku zawierającego polifenole. Maksymalne stężenie kwasu dihydroferulowego i kwasu dihydrokawowego w osoczu następuje po upływie 6-7 godzin [18,23].

Część metabolitów kwasu kawowego może być wydzielana z żółcią do światła przewodu pokarmowego, gdzie ulegają ponownie wchłonięciu lub wydaleni z organizmu z kałem. W badaniach farmakokinetycznych przeprowadzonych u ludzi stwierdzono obecność jedynie śladowych ilości kwasu chlorogenowego w moczu [12]. Wykazano natomiast

obecność w moczu kwasu kawowego oraz metabolitów, kwasu ferulowego i izoferulowego w postaci związanej z glukuronianem, jak również kwasu dihydroferulowego i kwasu wanilinowego w postaci wolnej [18,22].

Dotychczas nie opisano mechanizmu transportu kwasu kawowego do wnętrza komórek. Właściwości fizyko-chemiczne związku mogą odgrywać zasadniczą rolę w przenikaniu cząsteczek przez błony biologiczne. Z jednej strony występowanie w strukturze kwasu kawowego pierścienia aromatycznego warunkuje powinowactwo związku do lipidów, z drugiej strony obecność grupy karboksylowej i grup hydroksylowych powoduje, że związek jest w pewnym stopniu hydrofilny. Wykazano, że związki polifenolowe wnikają w dwuwarstwę lipidową komórki, jednak charakter oddziaływania z błonami komórkowymi i sposób wnikania cząsteczek do komórek nie został w pełni poznany [24].

2.2 ODDZIAŁYWANIE KWASU KAWOWEGO W ORGANIZMIE

Ze względu na fakt, że większość badań dotyczących wpływu kwasu kawowego na przemiany metaboliczne ma charakter badań epidemiologicznych, trudno jest scharakteryzować aktywność biologiczną tego związku w organizmie człowieka i innych ssaków. Ponadto wiele doniesień opisuje jedynie efekt biologiczny wywołany przez kwas fenolowy, brak w piśmiennictwie opisu pełnego molekularnego mechanizmu oddziaływania tego związku w organizmie.

Jednak nawet na podstawie wyników badań, które jedynie w pewnym zakresie badają oddziaływanie polifenoli można stwierdzić, że kwas kawowy wykazuje wielokierunkowy wpływ na organizm zarówno człowieka, jak i innych ssaków. Do tej pory najlepiej poznano właściwości przeciwutleniające tego związku. Antyoksydacyjne działanie kwasów fenolowych potwierdzono wielokrotnie zarówno w badaniach *in vitro*, jak i w badaniach *in vivo* u ssaków [25]. Zarówno kwas chlorogenowy, jak i kwas kawowy hamują peroksydację estrów cholesterolu, kwasów tłuszczowych i trójglicerydów frakcji LDL w osoczu krwi człowieka, zapobiegając w ten sposób tworzeniu blaszki miażdżycowej w tętnicach. Związki polifenolowe, także kwas kawowy, są bardzo efektywnymi zmiataczami wolnych rodników. Wytwarzanie w organizmie cząsteczek posiadających niesparowany elektron jest procesem fizjologicznym i wynika z przebiegu wielu reakcji biochemicznych, jednak nawet niewielki wzrost ilości tych czynników może przyczyniać się do uszkodzenia struktur komórkowych i funkcjonowania enzymów. Ze względu na fakt, że ilość glutationu w komórkach nie zawsze wystarcza do efektywnego zapobiegania niekontrolowanym reakcjom wolnorodnikowym, polifenole stanowią dodatkowe akceptory wolnych elektronów.

Prawdopodobnie kwas chlorogenowy, który nie uległ absorpcji w przewodzie pokarmowym, może wywierać efekt ochrony na uszkodzone komórki kolonocytów przed nowotworowymi czynnikami w trawionym pokarmie. Nie poznano specyfiki tego oddziaływania, jednak wyniki badań epidemiologicznych przeprowadzonych u ludzi wykazały odwrotną korelację pomiędzy spożyciem napojów zawierających kwas kawowy, a nowotworem okrężnicy [15].

Wiadomo, że przedłużający się stan podwyższonej ak-

Tabela 1. Wpływ polifenoli na przemiany węglowodanów u ssaków

WPŁYW POLIFENOLI NA MECHANIZMY REGULUJĄCE PROCES WCHŁANIANIA WĘGLOWODANÓW	
RODZAJ ODDZIAŁYWANIA	ŹRÓDŁO
zwiększają aktywność α -amylazy	32
tworzą kompleksy z cząsteczkami skrobi w świetle jelita i zmniejszają wydajność trawienia tego wielocukru	32, 33
hamują Na^+ zależny transport glukozy do wnętrza enterocytów ze światła jelita ciego	34
hamują transport glukozy przez receptor GLUT-2 w enterocytach	35
WPŁYW POLIFENOLI NA ENZYMY REGULATORYWNE GOSPODARKI WĘGLOWODANOWEJ	
zwiększają aktywność syntazy glikogenowej	33
obniżają aktywność fosforylasy glikogenowej	33
zwiększają aktywność dehydrogenazy gliceraldehydo 3-fosforanowej	36
obniżają aktywność karboksylkinazy fosfoenolopirogronianowej	37
WPŁYW POLIFENOLI NA POZIOM GLUKOZY W OSOCZU KRWI	
obniżają poziom glukozy w osoczu krwi	32,33,37

tywności enzymu lipooksygenazy-5 w organizmie człowieka odgrywa zasadniczą rolę w patomechanizmie rozwoju astmy i innych chorób o podłożu alergicznym. Wykazano hamujący wpływ kwasu kawowego na aktywność lipooksygenazy, co w efekcie może prowadzić do zahamowania reakcji alergicznej [27]. Jak do tej pory wyniki tych eksperymentów nie znalazły praktycznego zastosowania.

Istotnym kierunkiem badań wpływu kwasu kawowego na organizm jest określenie mechanizmu warunkującego jego przeciwnowotworowe właściwości. Działanie ochronne przed nowotworzeniem na komórki organizmu zaobserwowano w przypadku kilku związków polifenolowych, ale mechanizm (mechanizmy) tego działania są ciągle intensywnie badane. Przypuszcza się, że kwas chlorogenowy oraz kwas kawowy hamują tworzenie mutagennych i kancerogennych nitrozoamin. Kwasy fenolowe są inhibitorami reakcji N-nitrozylacji, zapobiegając w ten sposób przemianie prokancerogenów do kancerogenów [10]. W badaniach *in vitro* i *in vivo* u ludzi, wykazano, że kwas kawowy i kwas ferulowy mogą ochraniać skórę przed skutkami mutagennego promieniowania UV [28]. W badaniach prowadzonych na ludzkiej linii komórkowej Hep 3B udowodniono hamujący wpływ kwasu kawowego ekstrahowanego z propolisu na aktywność metaloproteinazy-9 (MMP-9), enzymu macierzy zewnątrzkomórkowej, który w warunkach fizjologicznych uczestniczy w procesach angiogenezy, gojenia ran i agregacji płytek. Zmiany aktywności metaloproteinaz charakterystyczne są dla wielu stanów patologicznych, takich jak procesy zapalne, choroby degeneracyjne, nowotworzenie. Metaloproteinazy odgrywają istotną rolę w progresji nowotworu poprzez pobudzanie wzrostu komórek raka, tworzenie przerzutów i aktywowanie miejscowej angiogenezy. Metaloproteinaza-9 (żelatynaza B) jest jednym z induktorów proliferacji komórek guza oraz przerzutów nowotworowych. Chociaż wpływ kwasu kawowego na aktywność metaloproteinaz nie został jeszcze w pełni scharakteryzowany, wyniki badań Parka i wsp. wykazały, że związek ten poprzez wpływ na aktywność metaloproteinaz może powodować nawet zahamowanie procesu proliferacji komórek nowotworowych [29].

Badano działanie przeciwbakteryjne oraz przeciwwirusowe kwasu kawowego. Stwierdzono, że polimery fenolowe

syntetyzowane z kwasu kawowego i kwasu chlorogenowego powodują inhibicję RNA zależnej polimerazy (rewertazy) u retrowirusów. Wyniki eksperymentów Sydowa i wsp. już w latach 80-tych wyznaczyły kierunek badań nad funkcją ochronną kwasu kawowego w infekcjach spowodowanych przez retrowirusy [30].

Stwierdzono, że kwas kawowy i metabolity tego związku oddziałują na przemiany biochemiczne zachodzące w komórkach wątrobowych. U gryzoni wykazano hepatoprotekcyjne oddziaływanie kwasu kawowego. W eksperymencie szczurom podawano wysokie dawki paracetamolu i tetrachloru węgla (CCl_4). Już niewielkie dawki kwasu kawowego (6 mg/kg) zapobiegały uszkodzeniom wątroby zwierząt laboratoryjnych wywołanych działaniem ksenobiotyków [26].

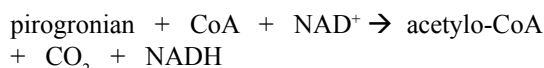
Nieliczne prace poświęcono badaniu oddziaływania polifenoli, w tym kwasu kawowego, na gospodarkę węglowodanową organizmów ssaków. Najczęściej wyniki eksperymentów opisują jedynie stwierdzenie istnienia efektu biologicznego w organizmie. Na przykład w badaniach z zastosowaniem kwasu kawowego przeprowadzonych u szczurów wykazano, że kwas kawowy powoduje spadek stężenia glukozy w surowicy szczurów z indukowaną cukrzycą typu I. Jednocześnie nie wykazano zmian stężenia glukozy w surowicy krwi zwierząt o prawidłowym metabolizmie [31]. Nie wiadomo, czy kwas kawowy wpływa na jeden określony czynnik warunkujący regulację glikemii, czy efekt fizjologiczny wywołany przez ten związek polifenolowy jest sumą kilku mechanizmów działania. Pomimo, że zwyczajowo przyjęło się zaliczać związki polifenolowe do grupy substancji regulujących metabolizm, dotychczas niewiele wiadomo o mechanizmach tego wpływu. Oddziaływanie polifenoli na przemiany węglowodanów u ssaków przedstawiono w Tabeli 1.

Do tej pory mechanizmy oddziaływania polifenoli na poziomie molekularnym poznano w niewielkim zakresie. Szczególnie interesujące jest określenie wpływu związków polifenolowych na kierunek przebiegu torów metabolicznych w organizmie człowieka. Nie badano wpływu polifenoli na aktywność kluczowego enzymu regulatorowego toku przemian węglowodanów i lipidów u ssaków, a mianowicie na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDH).

3. Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDH)

3.1 BUDOWA I FUNKCJA KOMPLEKSU DEHYDROGENAZY PIROGRONIANOWEJ (PDH)

Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej (PDH) katalizuje reakcję tlenowej dekarboksylacji pirogronianu do acetylo-CoA. Przebieg reakcji jest następujący:



W reakcji biorą udział kofaktory, takie jak pirofosforan tiaminy (TPP), amid kwasu liponowego oraz dinukleotydy flawinoadeninowy (FAD).

Kompleks PDH jest zespołem enzymów mitochondrialnych. Masa cząsteczkowa kompleksu PDH u ssaków wynosi przeciętnie około 9 200 kDa (38). W skład kompleksu PDH wchodzi ściśle określona ilość kopii trzech podjednostek: E1 - dehydrogenazy pirogronianowej (EC 1.2.4.1), E2 - acetylotransferazy dihydroliponianowej (EC 2.3.1.12) oraz E3 - dehydrogenazy dihydroliponianowej (EC 1.8.1.4). Ilość kopii poszczególnych podjednostek w kompleksie enzymatycznym różni się pomiędzy organizmami i jest z reguły charakterystyczna dla określonej tkanki. Ponadto w PDH występuje białko X zintegrowane z podjednostką E2. Z kompleksem PDH połączone są także enzymy regulatorowe: specyficzna kinaza dehydrogenazy pirogronianowej (PDK, EC 2.7.1.99) oraz fosfataza dehydrogenazy pirogronianowej (PDP) [38,39].

3.2 REGULACJA AKTYWNOŚCI KOMPLEKSU PDH

Aktywność kompleksu PDH zależy od stanu energetycznego organizmu [40]. W stanie fizjologicznej sytości kompleks ten jest aktywny, natomiast w okresach międzytrawiennych następuje ograniczenie aktywności PDH. W pierwszym przypadku pirogronian powstały w wyniku przemian glikolitycznych jest dekarboksylowany do acetyloCoA. W drugim przypadku w tkankach organizmu występuje ograniczenie katabolizmu glukozy do pirogronianu i spadek zużycia tego substratu. W tym okresie tkanki (z wyjątkiem erytrocytów) przekształcają inne niż glukoza substraty energetyczne, np. ciała ketonowe.

Aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej podlega precyzyjnej długo- i krótkoterminowej regulacji. Regulacja aktywności PDH w długim terminie wynika ze zmian aktywności transkrypcji genów dla białek kompleksu. Wykazano, że u ssaków ta forma regulacji aktywności

PDH zależy od rodzaju diety, wieku oraz aktywności fizycznej [38,39,41].

Krótkoterminowa regulacja aktywności PDH zachodzi poprzez modyfikację allosteryczną lub modyfikację kowalencyjną. Regulacja allosteryczna kompleksu następuje za pośrednictwem końcowych produktów dekarboksylacji pirogronianu, które hamują aktywność PDH. Wykazano na przykład, że acetylo-CoA oraz NADH są allosterycznymi inhibitorami kompleksu [38,39,41].

Główną rolę w krótkoterminowej regulacji aktywności PDH odgrywa modyfikacja kowalencyjna. Reakcja ta zachodzi poprzez odwracalną fosforylację i defosforylację kompleksu przy udziale wspomnianych wyżej enzymów regulatorowych, specyficznej kinazy PDH (PDK) oraz fosfatazy PDH (PDP). Przyłączenie fosforanu do kompleksu przez PDK powoduje utratę aktywności PDH, natomiast odłączenie fosforanu przez PDP przywraca aktywność enzymu [41].

3.3 BUDOWA KINAZY DEHYDROGENAZY PIROGRONIANOWEJ (PDK) ORAZ FOSFATAZY DEHYDROGENAZY PIROGRONIANOWEJ (PDP)

Wykazano, że PDK jest heterodimerem zbudowanym z dwóch podjednostek, α oraz β . Masa cząsteczkowa łańcucha α wynosi 48kDa, natomiast masa cząsteczkowa łańcucha β wynosi 45kDa. Podjednostka α pełni funkcję katalityczną natomiast podjednostka β pełni funkcje regulatorową. Dotychczas u ssaków zidentyfikowano cztery izoenzymy kinazy PDH. Enzymy te oznaczono jako PDK-1, PDK-2, PDK-3, PDK-4. Każda z izoform wykazuje tkankowo specyficzną ekspresję oraz kodowana jest przez inny gen, ponadto każda z izoform posiada odmienne właściwości kinetyczne (Tabela 2) [39,42].

Aktywność poszczególnych izoform uzależniona jest od obecności w środowisku reakcyjnym jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} oraz od pH środowiska. Pomimo tych różnic wspólną cechą wszystkich izoform PDK jest wysoka specyficzność w stosunku do kompleksu PDH [39,42].

Fosfataza dehydrogenazy pirogronianowej (PDP) jest heterodimerem, w skład którego wchodzi dwie podjednostki: katalityczna o masie cząsteczkowej 50 kDa oraz regulatorowa o masie 97kDa. W jednej cząsteczce enzymu podjednostki te występują w dwóch kopiach. Fosfataza PDH łatwo oddysocjowuje od kompleksu PDH, w odróżnieniu od PDK, która wykazuje silniejsze wiązanie z białkami kompleksu [44].

Budowę i funkcję PDP poznano i opisano w mniejszym stopniu, niż PDK. Do tej pory zidentyfikowano dwa izoenzymy fosfatazy PDH, które nazwano PDP-1, PDP2. Wyka-

Tabela 2. Tkankowo specyficzna ekspresja izoform PDK u szczurów [42,43]

Izoenzym	Tkanka	Specyficzna aktywność (nmol/min/mg białka)
PDK-1	mięsień sercowy	650+/-80
PDK-2	wszystkie tkanki	50+/-5
PDK-3	jądra	1250+/-200
PDK-4	mięśnie szkieletowe, mięsień sercowy, wątroba	400+/-60

ziano, że izoenzymy te wykazują specyficzne występowanie w określonych tkankach. Wysoką ekspresję PDP-1 wykazano w mięśniu sercowym, natomiast PDP-2, w wątrobie. Stwierdzono również, że istnieją różnice we właściwościach kinetycznych obu izoenzymów [38,44].

3.4 REGULACJA AKTYWNOŚCI KINAZY DEHYDROGENAZY PIROGRONIANOWEJ (PDK) ORAZ FOSFATAZY DEHYDROGENAZY PIROGRONIANOWEJ (PDP)

Aktywność PDK podlega regulacji krótko- i długoterminowej. Regulacja krótkoterminowa polega głównie na kontroli poprzez efekторы allosteryczne. Efekторы te regulują aktywność na zasadzie sprzężeń zwrotnych. Do tej grupy należą substraty i produkty reakcji tlenowej dekarboksylacji pirogronianu, katalizowanej przez kompleks PDH. Kwas pirogronowy powoduje inaktywację PDK, a w konsekwencji aktywację kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej. Wzrost aktywności PDK jest konsekwencją wzrostu stosunku stężeń [acetylo-CoA]/[CoA], potencjału oksydoredukcyjnego [NADH]/[NAD⁺], jak również wzrostu stosunku potencjału energetycznego [ATP]/[ADP] w komórce [40,41]. Aktywność PDK jest również regulowana stężeniem kofaktorów dla podjednostek kompleksu PDH [38]. Pirofosforan tiaminy wiążąc się z podjednostką E1 kompleksu powoduje zmianę konformacji enzymu i utrudnia połączenie PDK z tym białkiem. W wyniku tego procesu PDK nie może doprowadzić do inaktywacji kompleksu PDH [42].

Efekt inhibicji kompleksu PDH może być wzmocniony obecnością kationów w środowisku, np K⁺ i NH₄⁺ wzmagają hamowanie aktywności kinazy przez ADP [39]. Aktywność katalityczna PDK oraz PDP warunkowana jest stężeniem w środowisku jonów Mg²⁺ oraz Ca²⁺. Jony Mg²⁺ umożliwiają przyłączenie PDK do kompleksu PDH, natomiast jony Ca²⁺ pełnią istotną rolę w procesie przyłączenia PDP do kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej. Wykazano, że PDP jest bardziej wrażliwa na zmiany stężenia jonów w środowisku niż PDK. Stwierdzono także odmienny wpływ jonów na aktywność poszczególnych izoform PDP [44].

Aktywność PDK ściśle zależy od stanu energetycznego organizmu. W czasie głodu aktywność PDK jest wysoka, natomiast w okresie sytości aktywność PDK ulega ograniczeniu. U ssaków aktywność kinazy PDH związana jest ściśle z rodzajem tkanki i jej zapotrzebowaniem na substraty energetyczne [39].

Regulacja długoterminowa odbywa się poprzez regulację ekspresji genu dla izoenzymów PDK. Jednym z najważniejszych czynników wpływających na ekspresję genu w długim okresie czasu jest rodzaj diety. Wykazano, że dieta bogata w węglowodany ogranicza ekspresję PDK w wątrobie, natomiast wysoka zawartość w pożywieniu kwasów tłuszczowych pobudza aktywność syntezy białka dla PDK. Ponadto zaobserwowano, iż nienasycone kwasy tłuszczowe wywołują silniejszy efekt niż kwasy nasycone [45].

Wpływ diety na aktywność fosfatazy PDH nie został do końca wyjaśniony. Wykazano jednak, że aktywność PDP ma szczególne znaczenie w okresach międzyposiłkowych oraz w stanach zwiększonego zapotrzebowania na acetylo-CoA, takich jak wysiłek fizyczny [46].

3.5 KOMPLEKS PDH A METABOLIZM WĘGLOWODANÓW I LIPIDÓW

Prawidłowe funkcjonowanie organizmu zależy od właściwej regulacji metabolizmu węglowodanów, lipidów i aminokwasów. Zmiana kierunku przebiegu torów katabolizmu i syntezy tych związków wynika ze zmian stanu energetycznego organizmu [41]. Rolę regulatorową w natężeniu przemian metabolicznych substratów energetycznych spełnia kompleks dehydrogenazy pirogronianowej [42,46].

Zarówno zbyt niskie jak i zbyt wysokie stężenie substratów energetycznych we krwi, w szczególności glukozy w komórkach wątroby, stwarza zagrożenie dla właściwego funkcjonowania organizmu. Glukoza jest związkiem chemicznym osmotycznie czynnym, dlatego też w okresie poposiłkowym w wątrobie związek ten szybko ulega katabolizmowi w torze glikolizy [46]. W ten sposób w stanie sytości zwiększony katabolizm glukozy powoduje wzrost stężenia pirogronianu, a następnie przekształcanie tego związku do acetylo-CoA w reakcji katalizowanej przez kompleks PDH. AcetyloCoA może zostać skierowany na dwa odmienne tory metaboliczne. Po pierwsze związek ten ulega całkowitemu utlenieniu do CO₂ w cyklu kwasu cytrynowego. Aktywność PDK jest w tych warunkach ograniczona, co skutkuje wysoką aktywnością kompleksu PDH. Odmianym torem przemian acetylo-CoA powstałego z tlenowej dekarboksylacji pirogronianu jest synteza kwasów tłuszczowych. Acetylo-CoA, transportowany z mitochondriów do cytoplazmy, może być zużywany do syntezy kwasów tłuszczowych i cholesterolu [40]. Proces ten zachodzi aktywnie w stanie sytości, w największym stopniu w wątrobie i w tkance tłuszczowej. W ten sposób kompleks PDH można uważać za enzym regulatorowy przemian zarówno lipidów jak i węglowodanów. Kompleks dehydrogenazy pirogronianowej reguluje zatem proces katabolizmu glukozy, ponieważ w wyniku przemian katabolicznych acetylo-CoA wytwarzane są wiązania wysokoenergetyczne w procesie fosforylacji oksydatywnej. Z drugiej strony PDH reguluje procesy biosyntezy związków, dostarczając acetylo-CoA do syntezy lipidów i steroli [38,46].

W stanie głodu w większości tkanek następuje ograniczenie aktywności glikolizy, co zmniejsza dostępność pirogronianu, substratu dla kompleksu PDH. W konsekwencji dochodzi do wzrostu aktywności PDK i ograniczenia aktywności PDH. Glukoza może być wtedy syntetyzowana de novo z prekursorów w reakcji glukoneogenezy szczególnie aktywnie w tkance wątrobowej [38,46].

Spadek stężenia acetylo-CoA powstałego z dekarboksylacji pirogronianu katalizowanej przez PDH hamuje w następstwie syntezę de novo kwasów tłuszczowych w cytoplazmie. W tych warunkach ulega nasileniu tor β-oksydacji kwasów tłuszczowych. W stanie wysokiej aktywności procesu β-oksydacji wzrasta również aktywność PDK aktywowanej wysokim stężeniem kwasów tłuszczowych i ciał ketonowych oraz wysokim stosunkiem [acetylo-CoA]/[CoA], [NADH]/[NAD⁺] oraz [ATP]/[ADP] w mitochondriach. W efekcie aktywność kompleksu PDH zostaje zahamowana, a pirogronian ulega przekształceniu do glukozy na drodze glukoneogenezy [40,41]. Podobnie jak w stanie sytości, także w stanie głodu kompleks PDH stanowi etap regulatorowy przemiany węglowodanów i lipidów [39].

Utrzymanie stałego poziomu glukozy we krwi i odpowiedniego natężenia procesów katabolizmu i syntezy tego cukru oraz katabolizmu i syntezy kwasów tłuszczowych jest podstawą cyklu węglowodanowo - lipidowego. Mechanizm regulacji tego cyklu jest ściśle związany z aktywnością kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej. Rodzaj diety w znacznym stopniu modyfikuje aktywność kinazy PDH i w efekcie kierunek przebiegu reakcji cyklu [40].

Precyzyjna kontrola metabolizmu węglowodanów i lipidów warunkuje prawidłowe funkcjonowanie całego organizmu oraz utrzymanie prawidłowego stężenia glukozy we krwi. Centralną rolę w metabolizmie zarówno glukozy jak i kwasów tłuszczowych pełni wątroba. W razie potrzeby magazynowane w wątrobie zapasy glikogenu mogą ulegać szybkiej mobilizacji. W okresach między trawiennymi szlak syntezy glukozy de novo przebiega głównie w wątrobie. Prawidłowy przebieg tych procesów spełnia istotną rolę w regulacji poziomu glukozy we krwi i zapewnia właściwe zaopatrzenie tkanek w ten substrat energetyczny [46].

Rozregulowanie precyzyjnego funkcjonowania torów katabolizmu i syntezy glukozy prowadzi do wielu powikłań. Przykładem jest otyłość, przewlekłe schorzenie, którego podstawę stanowi zaburzenie naturalnego rytmu głód-sytość oraz cukrzyca, charakteryzująca się utrzymującą się hiperglikemią. Glikemię dodatkowo zwiększa nasiloną synteza glukozy w torze glukoneogenezy oraz rozkład glikogenu w wątrobie. Hiperglikemia oraz hiperlipidemia, towarzyszące cukrzycy, powodują wystąpienie szeregu zaburzeń w organizmie, których efektami są mikroangiopatia (retinopatia, nefropatia) i makroangiopatia (rozwój blaszek miażdżycowych) prowadzące do nadciśnienia, powikłań zakrzepowozatorowych, niedokrwienia tkanek (tzw. stopa cukrzycowa) oraz powikłań neurologicznych (neuropatia cukrzycowa).

W zapobieganiu negatywnym skutkom wynikającym z otyłości, istotne jest wyeliminowanie czynników ryzyka, przede wszystkim nadmiaru spożywanych pokarmów zawierających cukry proste oraz lipidy, szczególnie zawierające nasycone kwasy tłuszczowe a także zwiększenie aktywności fizycznej. Wyniki badań epidemiologicznych wskazują jednoznacznie, że dieta powinna zawierać owoce i warzywa. Pożywienie bogate w związki polifenolowe oraz właściwa aktywność fizyczna uwarunkowuje tkanki obwodowe na działanie insuliny, przez co stężenie glukozy, triacylgliceroli i cholesterolu frakcji LDL w surowicy ulega zmniejszeniu, natomiast stężenie cholesterolu HDL wzrasta [4,10,45].

3.6 WPLYW KSENOBIOTYKÓW NA AKTYWNOŚĆ PDK

Oprócz podstawowych składników pokarmu w diecie występują inne związki organiczne, które mogą regulować procesy metaboliczne organizmu. Aktywność PDK, a przez to i kompleksu PDH pozostaje pod wpływem różnych związków chemicznych o charakterze ksenobiotyków [47].

Do tej pory jednak nie poznano molekularnego mechanizmu oddziaływania kwasu kawowego na tor metaboliczny w organizmie człowieka. W szczególności nie badano wpływu tego związku polifenolowego na aktywność kluczowego enzymu regulatorowego toku przemian węglowodanów i lipidów u ssaków, a mianowicie na aktywność kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej (PDH).

Piśmiennictwo

1. Renaud S., De Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets and the French Paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 1992, 339, 1523 – 1526.
2. Caselli G., Lipsi R. Survival differences among the oldest old in Sardinia: who, what, where, and why? *Demography Res.*, 2006, 14, 267-294.
3. Wollin S. D., Jones P. J. Alcohol, red wine and cardiovascular disease. *J. Nutr.*, 2001, 131, 1401 – 1404.
4. Das K., Ursini F. Ed. Alcohol and wine in health and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2002.
5. Willcox B. i wsp. Caloric Restriction, the Traditional Okinawan Diet, and Healthy Aging: The Diet of the World's Longest-Lived People and Its Potential Impact on Morbidity and Life Span. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2007, 1114, 434-455.
6. Evans C. W. Trease and Evans Pharmacognosy. *Bailliere Tindall*, 2002, 214-252.
7. Dreosti I. E. Antioxidant Polyphenols in Tea, Cocoa and Wine. *Nutrition*. 2000, 16, 692-694.
8. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr.* 2000,130(8S Suppl):2073S-85S
9. Zhang J. i wsp. Metabolic studies on the total phenolic acids from the roots of *Salvia miltiorrhiza* in rats. *Biomed Chromatogr.* 2005 J;19, 51-9
10. Tapiero H. i wsp. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed Pharmacother.* 2002, 56, 200-7
11. Teissedre P., Landrault N., Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. *Food Research International*, 2000, 33, 461-467.
12. Otholf M.R., Hollman P.C., Katan M.B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr.* 2001, 131, 66-71
13. Hollman P., Katan M. Bioavailability and health effects of dietary flavonols in man. *Arch. Toxicol. Suppl*, 1998, 20, 237-48.
14. Fabelbum I.M., James S.P. The absorption and metabolism of methyl cinnamate. *Toxicology* 1997, 7, 123-132.
15. Otholf M.R., Hollman P.C., Katan M.B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J Nutr.* 2001, 131, 66-71.
16. Wolfram S. i wsp. A Na(+)-dependent mechanism is involved in mucosal uptake of cinnamic acid across the jejunal brush border in rats. *J Nutr.* 1995, 125, 1300-8
17. Rechner A. i wsp. Colonic metabolism of dietary polyphenols: influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radic Biol Med.* 2004, 36, 212-25.
18. Wittmer S. i wsp. Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans. *Phytomedicine.* 2005, 12, 28-38.
19. Scalbert A., Morand C., Manach C., Remesy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother.* 2002, 56, 276-82
20. Kota P. i wsp.. O-Methylation of benzaldehyde derivatives by „lignin specific” caffeic acid 3-O-methyltransferase. *Phytochemistry* 2004, 65, 837-46

21. Rechner A. i wsp. The Metabolic Fate of Dietary Polyphenols in Humans. *Free Rad. Biol. Med.* 2002, 33, 220-235.
22. Rechner A.R., i wsp. Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radic Biol Med* 2001, 30, 1213-22
23. Nardini M. i wsp.. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. *J Agric Food Chem.* 2002, 50, 5735-41
24. Nakayama T., Hasimoto T., Kajiya K, Kumazawa S., Affinity of polyphenols for lipid bilayers. *BioFactors*, 2000, 13, 147-151.
25. Hung C. i wsp. Evaluation of caffeic acid amide analogues as anti-platelet aggregation and anti-oxidative agents. *Bioorg Med Chem.* 2005 Mar 1;13(5):1791-7.
26. Janbaz K.H., Saeed S.A., Gilami A.H. Studies on protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. *Phytomedicine* 2004, 11, 424-30.
27. Uang Y.S., Kang F.L., Hsu K.Y. Determination of caffeic acid in rabbit plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1995, 673, 43-9
28. Saija A., Tomaino A., Trombetta D., De Pasquale A., Uccella N., Barbuzzi T., Paolino D., Bonina F. In vitro and vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int J Pharm.* 2000, 199, 39-47.
29. Park W.H., Kim S.H., Kim C.H. A new matrix metalloproteinase-9 inhibitor 3,4- dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from methanol extract of *Euonymus alatus*: isolation and structure determination. *Toxicology.* 2005, 207, 383-90
30. Sydow G. i wsp.. [The effect of phenolic polymers on retroviruses] *Pharmazie.* 1986, 41, 865-8. in German
31. Hsu F.L., Chen Y.C., Cheng J.T. Caffeic acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta Med.* 2000, 66, 228-30.
32. Thompson L.U. i wsp. Relationship between polyphenol intake and blood glucose response of normal and diabetic individuals. *Am. J. Clinical Nutr.* 1984, 39, 745-751.
33. Sudheesh V.A, Vijayalakshmi N.R. Effect of catechin on carbohydrate metabolism. *Ind. J. Biochem. Bioph.* 1997, 34, 406-408.
34. Shimizu M., Kobayashi Y., Suzuki M., Satsu H., Miyamoto Y. regulation of interstitial glucose transport by tea catechins. *Biofactors.* 2000, 13, 61-65.
35. Song J. i wsp.. Flavonoid Inhibition of SVCT1 and GLUT2, Intestinal Transporters for Vitamin C and Glucose. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 15252-15260.
36. Yoshikawa M. i wsp.. *Salacia reticulata* and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effect in rats. *Biochem. Mol. Action Nutr.* 2002, 3, 1819-1824.
37. Waltner-Law M. i wsp. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, repress hepatic glucose production. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 34933-34940.
38. Patel M., Roche T. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complex. *FASEB J.*, 1990, 4, 3224 – 3233.
39. Sugden M. i wsp. Studies of the long-term regulation of hepatic pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochem J.* 1998; 329, 89-94.
40. Sugden M.C., Holness M.J. The role of regulation of tissue pyruvate dehydrogenase complex activity during the starved-to-fed transition. *Ann N Y Acad Sci.* 1989, 573, 314-36.
41. Randle P.J., Priestman D.A. Shorter term and longer term regulation of pyruvate dehydrogenase kinases. *Lancet*, 1963, 12, 785-789.
42. Jones B. i wsp. Hepatic pyruvate dehydrogenase kinase activities during the starved-to-fed transition. *Biochem. Biophys. Acta*, 1992, 1134, 164-168.
43. Gudi R. i wsp. Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in humans. *J Biol Chem.* 1995, 270, 28989-94. Erratum in: *J Biol Chem* 1996, 271:1250.
44. Huang B. i wsp. Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA-derived amino acid sequences, expression, and regulation. *J Biol Chem.* 1998, 273,17680-8.
45. Priestman D. i wsp. Role of protein synthesis and of fatty acid metabolism in the longer-term regulation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochem J.* 1994, 300, 659-64
46. Sudgen M. i wsp. Mechanism involved in the coordinate regulation of strategic enzymes of glucose metabolism. *Advan. Enzyme Regul.* 1993, 33, 71 – 95.
47. Yamada K., Noguchi T. Nutrient and hormonal regulation of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression. *Biochem J.* 2002, 337, 1-11.

Adres do korespondencji:

Dr n. farm. Małgorzata Tyszką-Czochara
 ul Kosmonautów 5/107
 47-220 Kedzierzyn-Koźle
 e-mail: mtyszka@poczta.fm
 tel. 504 053 552

Wydawnictwo Kwieciński poleca

RECEPTURA

DLA LEKARZY, STUDENTÓW MEDYCYNY I STOMATOLOGII

Pod redakcją
Przemysława Nowaka
Zbigniewa S. Hermana
Ryszarda Brusa



2005

Regulamin redagowania prac w „Farmaceutycznym Przeglądzie Naukowym”

1. FPN zamieszcza prace oryginalne doświadczalne, kliniczne i poglądowe, z zakresu nauk farmaceutycznych, medycznych i nauk pokrewnych.
2. Manuskrypt w języku polskim lub angielskim należy przesyłać w formie elektronicznej na adres: fpn@kwiecinski.pl (w wyjątkowych przypadkach na dyskietce 3,5" lub dysku CD-ROM) oraz – w jednym egzemplarzu wydruku komputerowego (z tabelami, wykresami i rycinami) na adres Redakcji.
Opis dysku powinien zawierać imię i nazwisko pierwszego autora i tytuł pracy. Teksty i grafiki powinny tworzyć osobne zbiory. Nie należy umieszczać rycin i fotografii w plikach tekstowych. Redakcja zaleca użycie edytorów tekstów: Star Office, Word, Word Perfect. Preferowany format dla grafiki to *.TIFF, kolor: CMYK, rozdzielczość 300 dpi.
3. Prace podlegają ocenie przez recenzentów wyznaczonych każdorazowo przez Redaktora Naczelnego. Zachęca się autorów do proponowania nazwisk recenzentów. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania poprawek i skrótów tekstu (w porozumieniu z autorem).
4. Do pracy należy dołączyć oświadczenie, że praca nie była uprzednio publikowana ani nie została wysłana do redakcji innego czasopisma oraz – zgodę Kierownika Jednostki, skąd praca pochodzi, na zamieszczenie publikacji w czasopiśmie.
5. Wszystkie badania prowadzone na ludziach lub zwierzętach, które są przedmiotem pracy naukowej, opisanej w manuskrypcie, muszą mieć akceptację, odpowiednio, Komisji Bioetycznej lub Etycznej.
6. Przesłane materiały wraz z recenzją pozostają w dokumentacji redakcji.
7. Wydawca nabywa na zasadzie wyłączności ogół praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo do wydania drukiem, na nośnikach elektronicznych CD i innych oraz w Internecie). Dopuszcza się natomiast drukowanie streszczeń bez zgody Wydawcy.
8. Instrukcja dla autorów
 - 8.1. Maszynopis powinien być drukowany jednostronnie na białym papierze formatu A4, z zachowaniem podwójnego odstępu między wierszami oraz marginesem 2,5 cm.
 - 8.2. Strona tytułowa powinna zawierać: tytuł lub stopień naukowy, imię i nazwisko (imiona i nazwiska) autorów w pełnym brzmieniu, tytuł pracy w języku polskim i angielskim, nazwę placówki naukowej, oraz tytuł lub stopień naukowy, imię i nazwisko kierownika placówki naukowej, skąd pochodzi praca. U dołu strony należy podać imię i nazwisko oraz adres, telefon i e-mail autora odpowiedzialnego za korespondencję, dotyczącą manuskryptu.
 - 8.3. Druga strona manuskryptu powinna zawierać streszczenie (150–250 słów w języku polskim i angielskim), w którym należy podać krótkie wprowadzenie, cel badania, podstawowe procedury (wybór badanych osób lub zwierząt doświadczalnych, metody badań), główne wyniki oraz wnioski. Pod streszczeniem należy umieścić słowa kluczowe w języku polskim i angielskim, zgodnie z Medical Subject Headings Index Medicus.

8.4. Oryginalne prace powinny być podzielone na rozdziały, według schematu: wstęp, materiał i metody, wyniki badań, dyskusja oraz wnioski.

8.5. Piśmiennictwo powinno być ułożone wg kolejności cytowania w tekście pracy. Skróty tytułów czasopism powinny być zgodne z Index Medicus. Każda pozycja – pisana od nowego wiersza, powinna być opatrzona numerem oraz zredagowana zgodnie z niżej podanym przykładem:

· czasopismo naukowe:

Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007; 117: 557–67.

Jeżeli autorów jest więcej niż trzech, wówczas należy podać nazwisko pierwszego z nich, z dopiskiem „i wsp.”.

Komosińska–Vassev K i wsp.: Graves' disease-associated changes in the serum lysosomal glycosidases activity and the glycosaminoglycan content. *Clin Chim Acta* 2003; 331: 97–102.

· wydawnictwo zbiorowe:

Rodwell VW. Białka: struktura i właściwości. W: *Biochemia Harpera*. Red. Murray RK i wsp. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa 1994, 59–69.

· monografia:

Bańkowski E. *Biochemia*. Urban & Partner. Wrocław 2004.

Powołania w tekście, umieszczone w nawiasach kwadratowych, powinny być oznaczone cyframi arabskimi. Liczbę pozycji piśmiennictwa należy ograniczyć: w pracach oryginalnych do 20 pozycji, w poglądowych do 30 i w pozostałych do 10.

8.6. Ryciny (wykresy, rysunki, fotografie czarno-białe i kolorowe) powinny być umieszczone w osobnej kopercie, ponumerowane, opatrzone nazwiskiem autora i tytułem pracy, z zaznaczeniem „góra”, „dół”. Opisy rycin należy podać na oddzielnej stronie z numerami ilustracji podanymi cyframi arabskimi. Materiały ilustracyjne, poprzednio publikowane, należy zaopatrzyć w pisemną zgodę Wydawcy na ponowną publikację.

8.7. Tabele, umieszczone każda na osobnej stronie, należy ponumerować cyframi rzymskimi i opatrzyć tytułami umieszczonymi nad tabelą. Opisy tabel należy podać na oddzielnej stronie z numerami tabel, podanymi cyframi rzymskimi.

8.8. Zalecana objętość pracy oryginalnej i poglądowej wynosi 10, pozostałych – 5 stron.

Adres Redakcji:

Farmaceutyczny Przegląd Naukowy

43-300 Bielsko-Biała

ul. Wiśniowa 25/2

tel: 033/816 28 99

e-mail: fpn@kwiecinski.pl



PRENUMERATA

Prosimy o wypełnienie kuponu drukowanymi literami o dokonanie wpłat na pocście lub w banku. Będziemy wdzięczni za użycie naszego kuponu. Pierwszy egzemplarz pisma w ramach wykupionej prenumeraty otrzymają Państwo po około 2 tygodniach od dokonania wpłaty. Dodatkowych informacji udziela Dział Prenumeraty i Kolportażu:

Grupa Dr. A. R. Kwiecińskiego
ul. Wiśniowa 25/2, 43-303 Bielsko-Biała
TEL. 033 817 38 99

WYDAWCA



Nr rachunku odbiorcy:

74 1050 1070 1000 0090 6083 4158

ODBIORCA:

Grupa dr. A. R. Kwiecińskiego
ul. Wiśniowa 25/2, 43-303 Bielsko-Biała

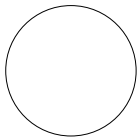
kwota:.....

wplacający:.....

.....

Zamawiam
FARMACEUTYCZNY PRZEGLĄD NAUKOWY

Nr



Nr rachunku odbiorcy:

74 1050 1070 1000 0090 6083 4158

ODBIORCA:

Grupa dr. A. R. Kwiecińskiego
ul. Wiśniowa 25/2, 43-303 Bielsko-Biała

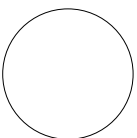
kwota:.....

wplacający:.....

.....

Zamawiam
FARMACEUTYCZNY PRZEGLĄD NAUKOWY

Nr



nazwa odbiorcy
Grupa dr. A. R. Kwiecińskiego

43-303 Bielsko-Biała, ul. Wiśniowa 25/2

I.k. nr rachunku odbiorcy
74 1050 1070 1000 0090 6083 4158

W P L N kwota

kwota słownie (wpłata)/nr rachunku (przelew)

nazwa i adres zleceniodawcy

nazwa i adres zleceniodawcy cd.

tytułem

tytułem cd.

PRENUMERATA FARMACEUTYCZNY PRZEGLĄD NAUKOWY

Pieczęć, data i podpis(y) zleceniodawcy (w przypadku przelewu)

Oplata

polecenie przelewu/wpłata gotówkowa

nazwa odbiorcy
Grupa dr. A. R. Kwiecińskiego

43-303 Bielsko-Biała, ul. Wiśniowa 25/2

I.k. nr rachunku odbiorcy
74 1050 1070 1000 0090 6083 4158

W P L N kwota

kwota słownie (wpłata)/nr rachunku (przelew)

nazwa i adres zleceniodawcy

nazwa i adres zleceniodawcy cd.

tytułem

tytułem cd.

PRENUMERATA FARMACEUTYCZNY PRZEGLĄD NAUKOWY

Pieczęć, data i podpis(y) zleceniodawcy (w przypadku przelewu)

Oplata

polecenie przelewu/wpłata gotówkowa

