

LIST OD REDAKTORA

Szanowni Czytelnicy,

niedawno obserwowaliśmy w Europie panikę wywołaną występowaniem śmiertelnych przypadków zatrucia pokarmowego odzwierzęcym typem *E. coli*. Fałszywie – jak się okazało – „winę” przypisano hiszpańskim ogórkom i pomidorom. Spowodowało to w konsekwencji masowe ograniczenie spożycia wszelkich warzyw i owoców. Mimo że prawdopodobnym źródłem infekcji były przemysłowo produkowane kielki sojowe, to dla wielu osób zaistniała sytuacja stała się dodatkowym argumentem usprawiedliwiającym ich wieloletnie błędy dietetyczne i kontynuowanie żywienia opartego na wysoko przetworzonych produktach – „bo tak jest bezpieczniej”. Tymczasem z ostatnio opublikowanych w „European Heart Journal” (2011 May; 32(10): 1235-43) badań EPIC (*European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition – Heart Study*), które objęły ośmioletnią obserwacją ponad 313 tysięcy zdrowych obywateli 8 krajów europejskich, jasno wynika, że ilość spożywanego codziennie warzyw i owoców, niezależnie od czynników ryzyka, determinuje śmiertelność z powodu niedokrwiennej choroby serca. Przy porównaniu spożycia (średnio) 240 g w stosunku do 640 g dziennie różnica w śmiertelności wynosi 22%.

W tym samym czasie co badanie EPIC, w „New England Journal of Medicine” (2011 June 23; 364: 2392-2404) ukazało się opracowanie grupy żywieniowców z Bostonu, oceniające przyczyny wzrostu masy ciała u prawie 120 tysięcy osób. W czteroletnich okresach obserwacji wykazano, że podstawowym czynnikiem wpływającym na masę ciała jest spożywanie chipsów ziemniaczanych, frytek, słodzonych napojów i czerwonego mięsa. Z kolei warzywa i owoce wraz z produktami zbożowymi, orzechy i jogurt mają właściwości przeciwstawne. Tak więc kolejny raz udowodniono, że przestrzeganie podstawowych zasad diety śródziemnomorskiej wpływa na zachowanie zdrowia i przede wszystkim zmniejsza ryzyko chorób układu sercowo-naczyniowego.

Przypominam, że zarówno o tych zagadnieniach, jak i o innych czynnikach patogenetycznych miażdżycy będziemy dyskutowali na tegorocznym zjeździe Polskiego Towarzystwa Badań nad Miażdżycą w dniach 20–23 października w zamku Krąg k. Koszalina. Zachęcam do aktywnego uczestnictwa i przesyłania streszczeń (patrz komunikat).

Z poważaniem
Marek Naruszewicz

Redakcja

Al. Powstańców Wielkopolskich 72
70-111 Szczecin
tel. (091) 466-15-09
tel./fax (091) 466-15-10
www.ptbnm.pl

Redaktor naczelny

prof. Marek Naruszewicz
tel. (022) 572-09-86
e-mail: marek.naruszewicz@wum.edu.pl

Sekretarz redakcji

mgr Kornel Chelstowski
tel. (091) 466-14-99
e-mail: kornelch@sci.pam.szczecin.pl

Rada redakcyjna

prof. Aldona Dembińska-Kieć
prof. Zdzisława Kornacewicz-Jach
prof. Grażyna Nowicka
prof. Michael Aviram
prof. Mirosław Dłużniewski
prof. Edward Franek
doc. Małgorzata Kozłowska-Wojciechowska
prof. Peter Schwandt
prof. Tomasz Guzik
doc. Piotr Socha
prof. Bogusław Okopień
prof. Władysław Sinkiewicz

Wydano na zlecenie PTBnM

Wydawca:

medical education

oficyna wydawnicza

02-201 Warszawa
ul. Opaczewska 60D
tel. (022) 862-36-63(64)

Dyrektor zarządzający

Andrzej Kowalczyk
tel. kom. 510-056-045
e-mail: andrzej.kowalczyk@mededu.pl

Biuro reklamy

Monika Banach
tel. kom. 500-021-471
e-mail: monika.banach@mededu.pl

Kierownik produktu

Maria Liedke
tel. kom. 501-343-249
e-mail: maria.liedke@mededu.pl

Opracowanie graficzne i skład:

Medical Education

Redakcja nie ponosi odpowiedzialności
za treść reklam i ogłoszeń.

Nakład: 5000 szt.

Czynniki Ryzyka

PISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA
BADAŃ NAD MIAŻDŻYCĄ

SPIS TREŚCI

Marek Naruszewicz List od Redaktora	1
ARTYKUŁ REDAKCYJNY Agnieszka Zajkowska, Anna Stachurska, Maciej Małecki MikroRNA-208 jako biomarker uszkodzenia mięśnia sercowego	3
Tomasz Stepek, Karolina Konstantynowicz, Agnieszka Mikłosz, Adrian Chabowski Udział białek transportujących (FAT/CD36, FABPm, FATP) w metabolizmie lipidów w mięśniach szkieletowych poddawanych wysiłkowi fizycznemu	10
Karina Ryterska, Ewa Siwiec FoxO – białka transkrypcyjne o szerokich możliwościach metabolicznych. Budowa, regulacja, metabolizm	18
Grzegorz Kopeć, Anna Tyrka, Piotr Podolec Miejsce wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 w wytycznych prewencji chorób sercowo-naczyniowych	26
Witold Pikto-Pietkiewicz Skojarzone leczenie fenofibratem i statyną jest skuteczne i bezpieczne u chorych z aterogenną dyslipidemią i cukrzycą typu 2. Komentarz do badania ACCORD	33
Magdalena Węglarz, Władysław Sinkiewicz, Joanna Banach, Ewa Żekanowska, Jan Błażejowski, Robert Bujak Wpływ konsumpcji różnych typów alkoholi na osoczowe stężenie czynnika tkankowego i jego inhibitora, selektyny E, selektyny P, trombomoduliny i białka C u młodych zdrowych ochotników płci męskiej	38
Małgorzata Kieć-Klimczak, Beata Kieć-Wilk, Anna Polus, Dominika Siedlecka, Paulina Jamrozik, Anna Chudy, Ewa Stępień, Iwona Wybrańska, Małgorzata Malczewska-Malec Hiperglikemia, „pamięć metaboliczna” i rozwój naczyniowych powikłań cukrzycy	47

mgr Agnieszka Zajkowska, mgr Anna Stachurska, prof. dr hab. n. farm. Maciej Małecki

MIKRORNA-208 JAKO BIOMARKER USZKODZENIA MIĘŚNIA SERCOWEGO

MICRONA-208 AS A BIOMARKER OF HEART FAILURE

Streszczenie

Dynamiczny rozwój diagnostyki molekularnej w zakresie chorób naczyniowo-sercowych możliwy jest dzięki postępom badań podstawowych oraz jednocześnie dzięki istnieniu ciągłej potrzeby poszukiwania nowych, bardziej optymalnych klinicznie biomarkerów pojawienia się i przebiegu chorób. Doniesienia naukowe wskazują, że markerami użytecznymi diagnostycznie mogą być również cząsteczki kwasów nukleinowych – miRNA. Stwierdza się, iż miRNA-208 może stanowić swoisty marker uszkodzenia mięśnia sercowego w przebiegu np. zawału czy zabiegów pomostowania aortalno-wieńcowego. Użyteczność kliniczną miRNA potwierdzają i zwiększają również badania wskazujące, że jest możliwe oznaczanie cząsteczek miRNA w płynach ustrojowych, np. krwi, moczu, ślinie.

Słowa kluczowe: diagnostyczne kwasy nukleinowe, mikroRNA, choroby serca

Abstract

The dynamic development of molecular diagnostics in the field of cardiovascular diseases is possible because of advances in basic research as well as a still existing need to seek new, more optimal clinical biomarkers of disease. Scientific reports indicate nucleic acids – miRNAs as the useful diagnostic markers. It is concluded that miRNA-208 may be a specific marker for myocardial damage in the course of heart attack or coronary artery bypass grafting. The clinical utility of miRNAs increases due to research indicating the possibility of determination of miRNA molecules in body fluids such as blood, urine, saliva.

Key words: diagnostic nucleic acids, microRNA, heart diseases

Wprowadzenie

Choroby układu krążenia zaliczane są do głównych przyczyn zgonów w krajach rozwiniętych. Promocja „zdrowego stylu życia” i profilaktyka, nowe leki i metody leczenia oraz przede wszystkim postępy w diagnostyce sprawiają, że możliwe jest konsekwentne ograniczanie zjawiska chorób naczyniowo-sercowych w wielu społeczeństwach [1]. Nie sposób przecenić znaczenia diagnostyki laboratoryjnej. Oznaczenie wybranych biomarkerów uwalnianych do krążenia pozwala na wykrycie uszkodzenia mięśnia sercowego na wczesnym etapie, a tym samym umożliwia podjęcie odpowiednich decyzji terapeutycznych. Niektóre ze znanych biomarkerów stały się „złotym standardem” w diagnostyce zawału mięśnia sercowego. Zalecenia dotyczące rozpoznania zawału mięśnia serca wskazują na istotną rolę troponi-

ny I (cTnI) oraz izoenzymu MB kinazy kreatynowej (CKMB) jako czułych i swoistych markerów martwicy kardiomiocytów. Wzrost stężenia tych białek w surowicy przekraczający 99. centyl zakresu referencyjnego jest obok zmian elektrokardiograficznych (EKG) i dowodów z badań obrazowych jednym z kryteriów rozpoznania świeżego zawału mięśnia sercowego [2]. Pomimo kluczowej roli troponin sercowych oraz CKMB w diagnostyce kardiologicznej ciągle prowadzone są badania dotyczące poszukiwania nowych, zbliżonych do optymalnych, użytecznych wskaźników laboratoryjnych w zakresie diagnostyki chorób naczyniowo-sercowych.

miRNA jako marker diagnostyczny

Idealny biomarker uszkodzenia mięśnia sercowego powinien pojawiać się w dużym stężeniu

niu w kardiomiocytach i być dla nich całkowicie swoisty. Nie powinien być wykrywany w osoczu ani w innym płynie ustrojowym u ludzi zdrowych, lecz po uszkodzeniu tkanki serca musi być szybko uwalniany do krążenia. Istotne jest też, aby jego ilość, np. w osoczu, była proporcjonalna do uszkodzenia narządu, powinien również oddawać zachodzące w czasie zmiany w narządzie i wpływ włączonej terapii. Nowy, oryginalny nurt w badaniach wyznaczają próby wykorzystania kwasów nukleinowych jako biomarkerów diagnostycznych. W ostatnim czasie wiele doniesień wskazuje na możliwość wykorzystania niskocząsteczkowych RNA w diagnostyce medycznej. Dowiedziono, że mikroRNA (miRNA) jest obecne w prawie wszystkich płynach ustrojowych i wydzielinach (osocze, łzy, ślina, mocz, kał, płyn owodniowy, płyn z jamy opłucnej i otrzewnowej) [3]. Ta niewątpliwie ważna informacja sprawia, że miRNA wydaje się unikatową klasą wskaźników diagnostycznych wielu różnych chorób. MikroRNA cechują się specyficznością tkankową i komórkową [4]. Co więcej, dotychczasowe doniesienia wskazują, że niektóre cząsteczki miRNA są całkowicie swoiste dla danego typu tkanki lub narządu [5]. Cząsteczki miRNA charakteryzują się dużą stabilnością w krążeniu, pomimo wysokiej aktywności RNaz obecnych w osoczu. Badania wykazały, że krążące miRNA nie są związane z komórkami lub fragmentami komórek [6]. Wskazuje się, że zaskakująca stabilność tych cząsteczek w osoczu jest wynikiem związania miRNA z pęcherzykami związanymi z błoną (ang. *membrane-bound vesicles*). Wśród nich można wyróżnić egzosomy, które są pęcherzykami o wielkości 50–90 nm powstającymi na drodze egzocytozy, oraz uwalniane z komórki mikropęcherzyki o wielkości 1 µm. Ostatnie badania nad unikatową trwałością miRNA w krążeniu wykazały, że znacząca ilość krążących miRNA jest związana z białkiem Argonaute 2 (Ago2) będącym częścią kompleksu rybonukleoproteinowego, uczestniczącego w biologicznej ścieżce działania miRNA [7]. MikroRNA charakteryzuje się także dużą stabilnością w osoczu również w warunkach laboratoryjnych. Na podstawie badań stwierdzono, że cząsteczki te w osoczu inkubowanym w temperaturze pokojowej zachowują integralność do 24 h. Nie ma zaś wystarczająco dużo dowodów, aby określić maksymalny czas przechowywania krwi pełnej aż do momentu jej odwirowania. W większości badań eksperymentalnych osocze lub surowicę uzyskiwano w ciągu 4 h od pobrania materiału. Ponadto, badany materiał może być przechowywany w temperaturze -80°C oraz wykazuje stabilność w procesie zamrażania i rozmrażania [8]. Wszystkie wymienione wyżej cechy cząsteczek miRNA przemawiają za możliwością wykorzystania ich jako wskaźników diag-

nostycznych. W 2008 roku po raz pierwszy wskazano cząsteczki miRNA jako nową, unikalną grupę krążących biomarkerów chorób nowotworowych [6, 9]. Dość duża część eksperymentów przeprowadzana jest w oparciu o badanie stężenia miRNA w osoczu lub surowicy [6], jednak nie brakuje także badań innych płynów ustrojowych. Oznaczenie stężenia miRNA-200a oraz miRNA-125a w ślinie może służyć jako nieinwazyjna metoda wykrywania raka płaskonabłonkowego, stanowiącego ok. 90% wszystkich nowotworów jamy ustnej [10]. Mocz jest materiałem, w którym zmieniona ekspresja miRNA-96 i miRNA-183 może świadczyć o nowotworze urotelialnym [11]. Oznaczane w różnych płynach ustrojowych niskocząsteczkowe RNA spełniają podobną funkcję – umożliwiają wykrycie choroby nowotworowej. Coraz więcej doniesień dowodzi także, iż miRNA może być użytecznym, mierzalnym markerem uszkodzenia różnych narządów, w tym serca [12] i wątroby [13]. Zmienioną ekspresję miRNA w osoczu wykazano również w trakcie różnych procesów fizjologicznych i patologicznych, m.in. w czasie ciąży [14] i reumatoidalnego zapalenia stawów [15].

Biologia miRNA

MikroRNA zaliczane jest do grupy małych, niekodujących, jednoniciowych cząstek RNA. Zadania, jakie spełniają niekodujące RNA, nie zostały do końca poznane, jednak określono, że powszechnie występujące miRNA pełni funkcje regulacyjne w procesie ekspresji genów na etapie posttranskrypcyjnym [16]. Szacuje się, że nawet 60% transkryptomu ssaków podlega regulacji miRNA [17]. W związku z tym, od momentu odkrycia w 1993 r. [18] miRNA stało się obiektem zainteresowania jako cząsteczka regulująca wiele procesów fizjologicznych, do których można zaliczyć: różnicowanie się i proliferację komórek macierzystych, rozwój serca, hematopoezę, neurogenezę, odpowiedź immunologiczną, apoptozę [19]. Działanie cząsteczek miRNA opiera się na połączeniu ze specyficznymi regionami w mRNA, co skutkuje zahamowaniem procesu translacji, a nawet degradacją łańcucha rybonukleinowego odpowiedzialnego za syntezę białek [16]. Poprzez taki mechanizm działania miRNA zaangażowane jest również w szereg procesów patologicznych, takich jak nowotworzenie [20], choroby autoimmunologiczne [21], neurodegeneracyjne [22] czy przerost i choroby mięśnia sercowego [23, 24].

Położenie genów zaangażowanych w syntezę miRNA nie zostało do końca poznane. Wiadomo, że znajdują się one między genami kodującymi białka (42% poznanych miRNA u człowieka) oraz w obrębie tych genów, w tym głównie w obrębie intronów genów kodujących białka (44%

poznanych miRNA u człowieka), a także w obrębie egzonów (7% poznanych miRNA u człowieka) oraz fragmentów 3' niepodlegających translacji (UTR) (1,5% poznanych miRNA u człowieka) i 5'UTR (1% poznanych miRNA u człowieka) [25]. Cechą wyróżniającą geny miRNA jest przede wszystkim ich częsty charakter policistronowy [26]. Warto dodać, że możliwość transkrypcji danych cząsteczek miRNA zależy od położenia ich genomu. MikroRNA, których genom znajduje się między genami kodującymi białka, ulegają oddzielnej transkrypcji, natomiast synteza intronowych lub egzonowych miRNA następuje zgodnie z transkrypcją genów, których są częścią [27].

Opisuje się, że proces syntezy miRNA może zachodzić na dwa sposoby oraz ma charakter wieloetapowy. Podczas konwencjonalnej drogi syntezy, z odpowiednich regionów dwuniciowego DNA powstaje pri-miRNA (*primary miRNA*). Transkrypcja pri-miRNA jest zależna od działania głównie polimerazy II [28], a także III RNA [29] i jest regulowana obecnością czynników transkrypcyjnych. Pri-miRNA jest stosunkowo długim fragmentem nukleinowym – składa się z kilku tysięcy par zasad. Charakterystyczne są dla tej cząsteczki struktury spinki do włosów oraz obecność 33-nukleotydu struktury, obejmującej pętlę i rdzeń zawierający sekwencję dojrzałego miRNA. Niektóre miRNA powstają w postaci 2–7 połączonych sekwencji w pojedynczym pri-miRNA [27]. Pri-miRNA w jądrze komórkowym ulega podziałowi na 60–70-nukleotydu fragmenty o strukturze spinki do włosów [27]. Proces ten zachodzi z udziałem białkowego kompleksu, składającego się z jądrowej rybonukleazy III, zwanej enzymem Droscha, oraz kofaktora DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) [30, 31]. Następnie, pre-miRNA transportowane jest przez błonę jądrową poprzez specyficzny transporter Exp-5 (eksportin-5) połączony z białkiem Ran o aktywności GTP-azy. Układ ten pozwala regulować transport pre-miRNA do cytoplazmy na zasadzie gradientu stężeń RanGTP/RanGDP. W jądrze komórkowym, gdzie ilość RanGTP jest znacznie większa, pre-miRNA związane jest silnie z transporterem. Hydroliza GTP wywołuje zmiany konformacyjne w białku Ran oraz dostarcza energii wykorzystywanej do odłączenia pre-miRNA od eksportyny-5 i uwolnienia go do cytoplazmy [32]. W kolejnym etapie dojrzewania pre-miRNA ulega przemianom w 18–22-nukleotydu dwupleksy miRNA. Proces ten zależny jest od rybonukleazy III, zwanej enzymem Dicer, oraz białka z rodziny Argonaute (Ago) [33]. Wytworzona w ten sposób rybonukleoproteina została nazwana kompleksem miRLC (*miRISC loading complex*). Dicer rozpoznaje strukturę dwuniciową kompleksu i rozcina cząsteczkę od miej-

sca podstawy struktury. W wyniku tego działania zostaje wycięta część trzonu spinki cząstki pre-miRNA zawierająca sekwencję dojrzałego miRNA. U człowieka w kompleksie miRLC występują również białka o charakterze helikazy Gemin3, Gemin4 oraz odpowiednik białka Ago – eIF2C2 [34]. Aktywność helikazy umożliwia rozplecenie nici wyciętego fragmentu dwuniciowego miRNA. Z uwagi na to, że tylko jedna z nici dwupleksu utworzy dojrzałe miRNA, druga, zwana nicią passenger lub miRNA*, ulega degradacji. Właściwa nić dojrzałego miRNA łączy się swoim końcem 3' z białkiem Ago i tworzy kompleks miRISC (*miR-induced silencing complex*), który może wpływać na syntezę białek, łącząc się z fragmentem 3'UTR w odpowiednim mRNA. Wykazano, że do prawidłowego utworzenia kompleksu miRNA/mRNA niezbędne jest komplementarne połączenie między 2.–7. nukleotydem na końcu 5' w strukturze miRNA (ang. *seed*) a strukturą 3'UTR. Pozostałe sekwencje miRNA nie wymagają całkowitej komplementarności z matrycowym RNA. Podstawowy region *seed* złożony jest z 6 nukleotydów, natomiast mogą one być modulowane poprzez dodawanie pojedynczych nukleotydów, tak aby w obrębie obszaru wiązania z mRNA znajdowało się 7 lub 8 nukleotydów. Regiony *seed* są wyjątkowo krótkie oraz konserwatywne, a komplementarne do nich nukleotydy mogą występować w wielu różnych mRNA. Dzięki temu jeden rodzaj miRNA może regulować liczne mRNA, będące częścią określonego szlaku biologicznego [35, 36].

Druga ścieżka powstawania miRNA omija etap działania jądrowej rybonukleazy Droscha. Opiera się ona na syntezie mirtronów, czyli fragmentów pochodzących z intronów. Mirtrony mają długość odpowiadającą ilości nukleotydów pre-miRNA, jednak wykazują niedoskonałą strukturę. Aby proces dojrzewania pre-miRNA mógł przebiegać zgodnie z drogą konwencjonalną, mirtrony muszą najpierw ulec rozpleceniu i ponownemu zwinieniu w strukturę spinki do włosów [35, 37, 38].

Ponad połowa genów kodujących białka wykazuje wrażliwość na działanie regulacyjne miRNA [17]. Dotychczas zlokalizowano ponad 15 000 genów u więcej niż 140 gatunków i opisano ponad 17 000 sekwencji dojrzałego miRNA [39]. Eksperymenty prowadzone są równocześnie i podejmują próbę zgłębienia wiedzy o cząsteczkach miRNA na wielu płaszczynach. W związku z tym, iż ekspresja miRNA jest swoista tkankowo bądź też komórkowo, pojawiają się próby ich wykorzystania w diagnostyce różnych chorób, w tym chorób mięśnia sercowego, jako specyficznych markerów uszkodzenia.

Rola „sercowych miRNA” w komórkach mięśnia sercowego

Dotychczas w komórkach mięśnia sercowego stwierdzono ekspresję głównie: miRNA-1, miRNA-133, miRNA-126, let-7, miRNA-499 oraz miRNA-208 [40]. Spośród nich rodzina miRNA-208, do której zalicza się miRNA-208a i miRNA-208b oraz miRNA-499, określana jest jako „myomiRs”, czyli cząsteczki regulatorowe, które zaangażowane są w kontrolę ekspresji izoform łańcuchów ciężkich miozyny: α i β w sercu [41]. Ten typ regulacji odpowiedzialny jest za patologiczną przebudowę serca, pracę mięśnia sercowego, zawartość miozyny w mięśniach [42], co jest szczególnie widoczne podczas przerostu mięśnia sercowego, niewydolności serca oraz chorób tarczycy [43]. Prawidłowa struktura i działanie mięśnia serca uzależnione jest od jakości i ilości włókien mięśniowych. Wyróżnia się włókna typu I, złożone z łańcuchów lekkich miozyny, oraz włókna typu II, w których skład wchodzi łańcuchy ciężkie miozyny (α MHC i β MHC). Włókna typu I zaliczane są do włókien wolno kurczących się i wolno męczących się, natomiast do cech wyróżniających włókna typu II należy zdolność do szybkiego kurczenia się i szybkiego męczenia. Białka α MHC i β MHC są odpowiedzialne za kurczliwość kardiomiocytów [44]. Różnią się zdolnością wykorzystywania energii pochodzącej z ATP do zmiennego tempa pracy mięśnia serca. α MHC, w odróżnieniu od β MHC, znane są jako białka szybko wykorzystujące ATP [42]. W ludzkim genomie stwierdzono 11 genów MHC (*MYH*), z czego tylko 3 są charakterystyczne dla komórek mięśnia serca. Wysoką ekspresją w miokardium odznaczają się geny *MYH6* i *MYH7* kodujące odpowiednio α MHC i β MHC, natomiast *MYH7b* wykazuje niską ekspresję w tej tkance, ale jest ściśle powiązany z *MYH6* i *MYH7*. Geny *MYH6* i *MYH7* położone są na chromosomie 14q12. Białka MHC charakteryzują się różnym poziomem występowania w sercu, w zależności od stopnia jego rozwoju oraz sprawności fizjologicznej. W sercach dojrzałych gryzoni przeważającą izoformą jest α MHC, natomiast u płodów dominującą jest izoforma β MHC [42]. U ludzi i dużych ssaków izoforma białka β MHC stanowi ok. 90% całkowitej ilości MHC w komórkach komory serca [45]. Co więcej, stwierdzono, że miRNA-208a jest całkowicie swoiste tylko dla mięśnia sercowego, natomiast miRNA-208b i miRNA-499 występują również w mięśniach szkieletowych [42].

Rodzina miRNA-208

Ze względu na ciągłe poszukiwania nowych biomarkerów uszkodzenia komórek mięśnia sercowego duże nadzieje wiąże się z badaniami nad cząsteczką miRNA-208. MikroRNA-208a po-

wstaje na matrycy intronu 29 [42] w genie *MYH6*, którego ekspresja prowadzi do powstania ciężkiego łańcucha α -miozyny (α MHC), natomiast matrycą dla miRNA-208b jest intron 31 genu *MYH7* [43]. Sekwencja miRNA-208a i miRNA-208b jest wysoce konserwatywna. Cząsteczki te różnią się bowiem jedynie trzema nukleotydami w regionie 3'. Ponieważ do utworzenia kompletnego połączenia miRNA z mRNA konieczna jest kompletność z regionem *seed*, a region ten jest taki sam w obu cząsteczkach miRNA-208, można wnioskować, że cząsteczki miRNA-208a i miRNA-208b mają takie samo docelowe mRNA [46]. Docelowym mRNA dla miRNA-208 są mRNA genów THRAP-1 (ang. *Thyroid hormone receptor [TR]-associated protein 1*) oraz miostatyna [46]. THRAP-1 należy do kompleksu receptora jądrowego hormonu tyroidowego i wspólnie z miostatyną znane są jako regulatory wzrostu mięśni oraz przerostu mięśnia serca [46]. Ekspresja sercowych miRNA (miRNA-208 oraz miRNA-499) zależna jest od stresu komórkowego oraz działania trijodotyroniny (T3). Regulacja ekspresji miRNA-208 pod wpływem działania hormonów tarczycy jest szczególnie widoczna w inwersji dominacji cząsteczek miRNA-208 w sercu myszy. Szczurze kardiomiocyty traktowane hormonami tarczycy wykazywały znaczne obniżenie ekspresji β MHC/miRNA-208b oraz istotny wzrost α MHC/miRNA-208a [46]. W odpowiedzi na nadmierne obciążenie mechaniczne mięśnia sercowego, mogące prowadzić do jego przerostu, zwiększona zostaje ekspresja β MHC, a tym samym miRNA-208b [46]. Cząsteczka miRNA-208 reguluje ekspresję ciężkich łańcuchów β -miozyny (β MHC) kodowanych przez gen *MYH7*. W oparciu o wytworzony model tego procesu uważa się, że stres komórkowy jest odpowiedzialny za zmniejszenie transkrypcji genu α MHC, a tym samym obniżenie stężenia miRNA-208a [47]. W efekcie zostaje zniesione blokowanie translacji genu THRAP-1, co skutkuje wzrostem produkcji β MHC. Ponadto badania wykazały, że przerost mięśnia serca może wywołać nadekspresję miRNA-208a [46]. W warunkach fizjologicznych miRNA-208 nie wpływa na powstawanie zmian w kardiomiocytach, ale ekspresja miRNA-208a jest konieczna do prawidłowego przewodzenia w mięśniu sercowym. Fizjologiczne przekazywanie impulsów elektrycznych między kardiomiocytami jest uzależnione od prawidłowego funkcjonowania połączeń międzykomórkowych (ang. *gap junction*). Cząsteczka miRNA-208a uczestniczy w regulacji ekspresji białek tworzących wspomniane połączenia międzykomórkowe, takich jak koneksyna 40 (Cx40) i czynniki transkrypcyjne GATA4 i HOP (ang. *homeodomain-only protein*). Wykazano również, że nadekspresja tej cząsteczki

w kardiomiocytach związana jest z zaburzeniem rytmu serca prowadzącym do arytmii [46].

Perspektywy wykorzystania miRNA-208 jako markera diagnostycznego chorób serca

Na skutek niedokrwienia mięśnia sercowego, a w następstwie zawału dochodzi do zmian przepuszczalności błony komórkowej komórek mięśnia serca i ostatecznie do ich martwicy. Wówczas cząsteczki miRNA są uwalniane do krwi obwodowej. Badania dotyczące diagnostycznej roli miRNA w przebiegu uszkodzeń mięśnia sercowego wskazują na podwyższoną ekspresję w sercu miRNA-499, miRNA-208a oraz miRNA-1, miRNA-133. W toku szczegółowych analiz zidentyfikowano, że miRNA-1 oraz miRNA-133 wykazują podwyższoną ekspresję zarówno w sercu, jak i w mięśniach szkieletowych [12].

MikroRNA-499 jest eksprymowany głównie w mięśniu sercowym, podwyższoną ekspresję stwierdza się również w mięśniach szkieletowych [12]. Dotychczasowe dane pokazują, że stężenie miRNA-208 w surowicy dobrze koreluje ze stężeniem cTnI, klasycznego markera uszkodzeń mięśnia sercowego. W celu określenia, czy miRNA specyficzne dla mięśnia sercowego może służyć jako biomarker uszkodzeń komórek sercowych, wykonywane są bardzo często badania na gryzoniach. Wykazano np. wzmożoną ekspresję miRNA-208 w modelu indukowanego izoproterenolem uszkodzenia miokardium [48]. W kolejnej części badania udowodniono brak wpływu operacyjnie wywołanego zawału nerki u zdrowych probantów na ekspresję miRNA-208, a także brak wpływu przeciążenia lewej komory (LV) przy jednoczesnym wzroście stężenia NT-proBNP. Niezwykle istotne jest to, że właśnie w takich sytuacjach często dochodzi do niespecyficznego wzrostu cTnI. Co ważne, w populacji zdrowych szczurów miRNA-208 było niewykrywalne we krwi obwodowej [48]. W innych badaniach w kierunku miRNA charakterystycznych dla mięśnia sercowego wykazano, że podczas uszkodzenia serca dochodzi do wzrostu miRNA-208a w osoczu krwi. Okazuje się, że miRNA-208a jest niewykrywalne w osoczu krwi ludzi zdrowych, w chorobie niedokrwiennej serca oraz w innych chorobach układu krążenia. W 90,9% przypadków ostrego zawału serca wykryto w osoczu krwi miRNA-208a [49]. Ponadto miRNA-208a jest dość wcześnie wykrywalny, bo już w pierwszej godzinie od uszkodzenia kardiomiocytów pojawia się w osoczu, szczyt wydzielania przypada na 3 godziny od uszkodzenia, a w 6.–12. godzinie stężenie spada do wartości niemierzalnych, a po 24 godzinach zanika całkowicie [12]. MikroRNA-208a charakteryzuje się wysoką wrażliwością i specyficznością w diagnozowaniu

uszkodzenia mięśnia sercowego. W 85% przypadków incydentu zawałowego stężenie miRNA-208a było równolegle wykrywalne z cTnI, klasycznym markerem zawału, co wskazuje na to, iż miRNA-208a może być wysoko czułym i wczesnym markerem AMI (*acute myocardial infarction*), szczególnie w ciągu 4 h od wystąpienia początkowych objawów [12]. Doniesienia z literatury wskazują również na miRNA-208b oraz miRNA-499 jako biomarkery odzwierciedlające uszkodzenie serca w chorobach układu krążenia, takich jak: ostry zawał serca, wirusowe zapalenie mięśnia sercowego, dysfunkcja rozkurczowa oraz ostra niewydolność serca [50]. Wykazano, że w przypadku ostrego zawału mięśnia sercowego dochodzi do znacznego wzrostu miRNA-208b oraz miRNA-499 w osoczu krwi, ściśle koreluje on ze wzrostem troponin T, wskazując na uszkodzenie kardiomiocytów. Pacjenci z wirusowym zapaleniem mięśnia sercowego w ostrej fazie wykazywali znaczny wzrost miRNA-208b oraz miRNA-499 w osoczu; poziom ich ekspresji korelował ze stadium zaawansowania przebiegu zakażenia. W przypadku zawału mięśnia sercowego stężenie miRNA znacząco wzrastało w osoczu w porównaniu ze stężeniem mikroRNA w wirusowym zapaleniu mięśnia sercowego. Z kolei w ostrej niewydolności serca odnotowano jedynie łagodny wzrost miRNA-499 [50]. Prowadzone są również prace w kierunku wykorzystania kardiospecyficznych cząsteczek miRNA jako użytecznych wskaźników uszkodzenia mięśnia sercowego w przebiegu operacji pomostowania aortalno-wieńcowego (CABG). Wstępne badania na niewielkiej grupie pacjentów (n=30) wykazują, że przed zabiegiem CABG stężenie miRNA-208 w osoczu jest niewykrywalne, natomiast obecność miRNA-208 obserwuje się u 80% pacjentów po operacji CABG, u większości już w 3 h po operacji. W przeprowadzonym badaniu stężenie miRNA-208 obniżało się do niewykrywalnego (Ct ≥ 40) w 6 h oraz w 12 h (n=10) po CABG. Stężenie troponiny I utrzymywało się na poziomie $>0,1$ ng/ml u wszystkich badanych po zabiegu CABG [51].

Podsumowanie

Dynamiczny rozwój dyscyplin biomedycznych sprawia, że badania prowadzone w jednostkach naukowych dostarczają informacji poznawczych, a także bezpośrednio klinicznych, aplikacyjnych. Cząsteczki miRNA, które są przedmiotem zainteresowania laboratoriów badawczych, regulują ekspresję wielu genów oraz mogą stanowić grupę biomolekuł o znaczeniu diagnostycznym, np. w zakresie chorób naczyniowo-sercowych. Wydaje się, że miRNA-208 jest kardiospecyficznym markerem pozwalającym diagnozować występowanie i przebieg chorób serca. Obecnie

większość informacji dotyczących nowych, niebiałkowych biomarkerów opartych na kwasach nukleinowych pochodzi z badań podstawowych i wstępnych prac klinicznych. Kontynuacja pracy jest niezbędna do odpowiedzialnego wprowadzenia miRNA do rutynowej diagnostyki molekularnej chorób naczyniowo-sercowych.

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. farm. Maciej Małecki
Zakład Biologii Molekularnej
Wydział Farmaceutyczny Warszawskiego Uniwersytetu
Medycznego
02-097 Warszawa, ul. Banacha 1
tel.: (22) 572-07-35, 606-448-502
e-mail: maciej.malecki@wum.edu.pl
www.farmacjamolekularna.wum.edu.pl

Piśmiennictwo:

1. Narodowy Program Zdrowia na lata 2007-2015. Załącznik do Uchwały Nr 90/2007 Rady Ministrów z dnia 15 maja 2007 r.
2. Thygesen K., Alpert J.S., White H.D.; Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Circulation* 2007, 116(22): 2634-53.
3. Schler N., Langer Ch., Dohner H. et al.: Serum microRNAs as a novel class of biomarkers: a comprehensive review of the literature. *Exp. Hematol.* 2010, 38: 1126-1130.
4. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A. et al.: Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. *Curr. Biol.* 2002, 12: 735-739.
5. Callis T.E., Pandya K., Seok H.Y. et al.: MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J. Clin. Invest.* 2009, 119: 2772-2786.
6. Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M. et al.: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105: 10513-10518.
7. Arroyo J.D., Chevillet J.R., Kroh E.M. et al.: Argonaute 2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *PNAS* 2011, 108: 5003-5008.
8. Kroh E.M., Parkin R.K., Mitchell P.S. et al.: Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010, 50: 298-301.
9. Lawrie C.H., Gal S., Dunlop H.M. et al.: Detection of elevated levels of tumor-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2008, 141: 672-675.
10. Park N.J., Zhou H., Elashoff D. et al.: Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15: 5473-5477.
11. Yamada Y., Enokida H., Kojima S. et al.: MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci.* 2011, 102: 522-529.
12. Wang G.K., Zhu J.Q., Zhang J.T. et al.: Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnostic of acute myocardial infarction in humans. *Eur. Heart J.* 2010, 31: 659-666.
13. Wang K., Zhang S., Marzolf B. et al.: Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Clin. Chem.* 2009, 55: 1977-1983.
14. Gilad S., Meiri E., Yogev Y. et al.: Serum MicroRNAs Are Promising Novel Biomarkers. *PLoS ONE* 2008, 3: e3148.
15. Murata K., Yoshitomi H., Tanida S. et al.: Plasma and synovial fluid microRNAs as a potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2010, 12: R86.
16. Carthew R.W., Sontheimer E.J.: Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009, 136: 642-655.
17. Friedman R.C., Farh K.K., Burge C.B., Bartel D.P.: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009, 19: 92-105.
18. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V.: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993, 75: 843-854.
19. Alvarez-Garcia I., Miska E.A.: MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005, 132: 4653-4662.
20. Chen C.Z.: MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N. Engl. J. Med.* 2005, 353: 1768-71.
21. Pauley K.M., Cha S., Chan E.K.: MicroRNA in autoimmunity and autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* 2009, 32: 189-1894.
22. Nelson P.T., Wang W.X., Rajeev B.W.: MicroRNAs (miRNAs) in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol.* 2008, 18: 130-138.
23. Sayed D., Hong C., Chen I.Y. et al.: MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 2007, 100: 416-424.
24. Ikeda S., Kong S.W., Lu J. et al.: Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol. Genomics* 2007, 31: 367-373.
25. Wang Z.: MicroRNA: A matter of life or death. *World J. Biol. Chem.* 2010, 21: 41-54.
26. Tanzer A., Stadler P.F.: Molecular evolution of a microRNA cluster. *J. Mol. Biol.* 2004, 339: 327-335.
27. Lee Y., Jeon K., Lee J.T. et al.: MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002, 21: 4663-4670.
28. Lee Y., Kim M., Han J., Yeim K., Lee S., Baek S.H., Kim V.N.: MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004, 23: 4051-4060.
29. Boerchert G.M., Lanier W., Davidson B.L.: RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006, 13: 1097-1101.
30. Lee Y., Ahn C., Han J. et al.: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003, 425: 415-419.
31. Han J., Lee Y., Yeom K.H. et al.: The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004, 18: 3016-3027.
32. Yi R., Qin Y., Macara I.G., Cullen B.R.: Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003, 17: 3011-3016.
33. Chendrimada T.P., Gregory R.I., Kumaraswamy E. et al.: TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005, 436: 740-744.
34. Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S. et al.: miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 2002, 16: 720-728.
35. Condorelli G., Latronico M.V.G., Dorna G.W. 2nd.: microRNA in heart disease: putative novel therapeutic targets? *Eur. Heart J.* 2010, 31: 649-658.
36. Starega-Roslan J., Koscińska E., Kozłowski P., Krzyżosiak W.J.: The role of the precursor structure in the biogenesis of

microRNA. *Cell Mol. Life Sci.* 2011 [online]. **37**. Berezikov E., Chung W.J., Willis J. et al.: Mammalian mirtron genes. *Mol. Cell.* 2007, 28: 328-336. **38**. Ruby J.G., Jan C.H., Bartel D.P.: Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 2007, 448: 83-86. **39**. Kozomara A., Griffiths-Jones S.: MiRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39: D152-157.

40. Shiyong Y., Guohong L.: MicroRNA Expression and Function in Cardiac Ischemic Injury. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* 2010, 3: 241-245. **41**. Van Rooij E., Quiat D., Johnson B.A. et al.: A family of microRNA encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev. Cell.* 2009, 17: 662-673. **42**. Liu N., Olson E.N.: MicroRNA Regulatory Networks in Cardiovascular Development. *Dev. Cell.* 2010, 18: 510-525. **43**. Dorn G.W. 2nd.: MicroRNA in cardiac disease. *Transl. Res.* 2011, 157: 226-235. **44**. Węgrzynowska-Teodorczyk K., Jankowska E.A., Banasiak W. et al.: Znaczenie treningu oporowego w redukcji mięśniowych następstw niewydolności serca. *Kardiol. Pol.* 2008, 66: 434-442.

45. Miyata S., Minobe W., Bristow M.R. et al.: Myosin heavy chain isoforms expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ. Res.* 2000, 86: 386-390. **46**. Callis T.E., Pandya K., Seok Y. et al.: MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J. Clin. Invest.* 2009, 119: 2772-2786. **47**. van Rooij E., Sutherland L.B., Qi X. et al.: Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007, 316: 575-579. **48**. Xu J., Rie T., Yumiko H. et al.: Plasma miR-208 as a Biomarker of Myocardial Injury. *Clin. Chem.* 2009, 55: 1944-1949. **49**. Xiao J., Chen Y.H.: MicroRNAs: Novel Regulators of the Heart. *J. Thorac. Dis.* 2010, 2: 43-47.

50. Corsten M., Dennert R., Jochems S. et al.: Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 Reflect Myocardial Damage in Cardiovascular Disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2010, 3: 499-506. **51**. Zajkowska A., Kołsut P., Białek S., Sitkiewicz D., Małeckki M.: MIRNA as a novel biomarker of myocardial injury: studies on CABG patients. IFCC-WorldLab-Euromedlab; Berlin 2011 (abstract no. LVCZ6).

UDZIAŁ BIAŁEK TRANSPORTUJĄCYCH (FAT/CD36, FABPpm, FATP) W METABOLIZMIE LIPIDÓW W MIĘŚNIACH SZKIELETOWYCH PODDAWANYCH WYSIŁKOWI FIZYCZNEMU

THE ROLE OF FATTY ACID TRANSPORT PROTEINS (FAT/CD36, FABPpm,
FATP) IN LIPID METABOLISM IN SKELETAL MUSCLES DURING EXERCISE

Streszczenie

Komórki mięśniowe w trakcie czynności skurczowej zużywają znaczne ilości ATP, zależnie od intensywności wysiłku fizycznego. Skutkuje to ciągłym zapotrzebowaniem na ATP w miocytach. Substratami energetycznymi, które odgrywają zasadniczą rolę w pozyskiwaniu ATP podczas wysiłku fizycznego, są: glukoza i wolne kwasy tłuszczowe (WKT). Transport glukozy do wnętrza miocytów następuje w głównej mierze w wyniku nasilenia obecności transporterów dla glukozy (GLUT-1, GLUT-4) w błonie komórek mięśniowych. Natomiast przechodzenie WKT do wnętrza miocytów zachodzi zarówno na drodze dyfuzji biernej, zgodnie z gradientem stężeniowym WKT (tzw. mechanizm flip-flop), jak również na drodze transportu wspomaganego przez białkowe transportery. Białkami biorącymi udział w procesie transportu wspomaganego są: FAT/CD36 – translokaza kwasów tłuszczowych, FABPpm – plazmatyczne białko wiążące kwasy tłuszczowe, FATP 1-6 – białko transportujące kwasy tłuszczowe. Wykazano, że podczas wysiłku fizycznego dochodzi do zwiększenia aktywacji układu współczulnego, który przyczynia się do wzmocnienia procesu lipolizy tkanki tłuszczowej i wzrostu uwalniania WKT, a tym samym powoduje wzrost gradientu stężeń w poprzek błony komórkowej. Jest to czynnik powodujący zwiększenie napływu WKT do wnętrza miocytów, niemniej jednak w ostatnio prowadzonych badaniach stwierdzono, że niezależnie od stężenia lipidów w łożysku naczyniowym, podczas trwania wysiłku fizycznego, w miocytach kurczących się obserwowana jest także wzmocniona

ekspresja białkowych przenośników WKT w błonie komórkowej. W niniejszej pracy omówiony zostanie udział białkowych transporterów kwasów tłuszczowych w metabolizmie lipidów podczas wysiłku fizycznego.

Słowa kluczowe: FAT/CD36, FABPpm, FATP, wysiłek fizyczny, mięśnie szkieletowe

Abstract

Contracting skeletal muscles consume great amounts of ATP, that must be immediately and constantly regenerated. The main energy substrates, for contracting muscle cells, are glucose and long chain fatty acids (LCFAs). Glucose is transported across the sarcolemma by the use of glucose transporters (GLUT-1, GLUT-4). LCFAs are taken up by either passive diffusion or via a protein-mediated mechanism involving sarcolemmal LCFA-binding proteins (i.e., FABPpm, FAT/CD36 and FATP-1). It is well established that exercise activates sympathetic nervous system which leads to increased lipolysis of adipose tissue. This creates an increase in LCFA serum-myocyte gradient, favoring LCFA passive diffusion into myocytes. However, recent data provide new insights regarding LCFA movement across sarcolemma. These studies show involvement of protein mediated LCFA transport during exercise. Depending on exercise intensity the expression of plasma membrane fatty acid transporters is changing which leads to the adequate change in LCFA influx into myocytes.

Key words: FAT/CD36, FABPpm, FATP, exercise, skeletal muscle

Wprowadzenie

Glukoza i kwasy tłuszczowe to podstawowe substraty energetyczne dla mięśni szkieletowych. Ich wykorzystywanie w miocytach zależy nie tylko od biodostępności osoczowej, ale także od obecności transporterów na poziomie błony komórkowej komórek mięśniowych. Glukoza jako związek hydrofilowy wymaga połączenia ze swoistym nośnikiem białkowym (GLUT-1, GLUT-4) zlokalizowanym w błonie komórkowej, by następnie zostać przetransportowana przez lipidową błonę komórkową. Natomiast kwasy tłuszczowe jako związki hydrofobowe mogą swobodnie przenikać przez ww. błonę komórkową. Przechodzenie lipidów do wnętrza miocytów przebiega zgodnie z gradientem stężeń wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) pomiędzy przedziałem zewnątrzkomórkowym a wnętrzem komórki. Ostatnio prowadzone badania wskazują jednakże na współobecność innego mechanizmu transportu dokomórkowego WKT. Jest to proces dyfuzji wspomaganą, zachodzący przy udziale swoistych przenośników białkowych (FAT/CD36, FABPpm, FATP 1-6), które z jednej strony mają łączność ze strukturą podwójnej błony lipidowej, a z drugiej strony wiążą cząsteczki wolnych długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Chociaż dokładny mechanizm przechodzenia WKT w poprzek błony komórkowej nie został wyjaśniony, to jednoznacznie wykazano, że wzrost ekspresji błonowej transporterów w miocytach nasila transport WKT do wnętrza komórki mięśniowej mimo braku adekwatnych zmian stężenia osoczowego kwasów tłuszczowych. Niniejsza praca przeglądowa dotyczy udziału białkowych transporterów WKT w transporcie kwasów tłuszczowych w mięśniach szkieletowych, zwłaszcza podczas wysiłku fizycznego.

Białka biorące udział w dokomórkowym transporcie kwasów tłuszczowych

Dotychczas zidentyfikowano trzy rodzaje białkowych transporterów wolnych kwasów tłuszczowych: FAT/CD36 (*fatty acid translocase*, translokaza kwasów tłuszczowych), FABPpm (*plasma membrane associated fatty acid binding protein*, plazmatyczne białko wiążące kwasy tłuszczowe), FATP 1-6 (*fatty acid transport protein*, białko transportujące kwasy tłuszczowe).

Białkiem, które w największym stopniu zachowuje łączność z błoną komórkową, jest FATP [1]. Jednocześnie jest to jedyne białko, które wykazuje aktywność enzymatyczną (FAS, syntetazy acylo-CoA). FATP to rodzina sześciu różniących się konstytucjonalnie białek o masie około 63 kDa, zbudowanych z 311 aminokwasów ułożonych w trzech łańcuchach przebiegających poprzecznie do struktury błony lipidowej, koniec aminowy uło-

żony jest zewnątrzkomórkowo, a koniec węglowy skierowany jest do wnętrza komórki [2]. Każdy z sześciu podtypów FATP cechuje się wysokim stopniem swoistości co do miejsca występowania. FATP 1 znajduje się w przeważającej mierze w mięśniach szkieletowych i w tkance tłuszczowej. W wątrobie zlokalizowano zarówno FATP 5, jak i FATP 2 (z tym, że FATP 2 występuje także w nerkach). W przewodzie pokarmowym odnotowano nasiloną ekspresję FATP 3. To białko zostało zlokalizowane także w wątrobie, trzustce i w płucach. Wydaje się, że transporterem WKT o najszerszym spektrum ekspresji tkankowej (spośród wszystkich FATP) jest FATP 4. Stwierdzono obecność FATP 4 między innymi w jelicie cienkim, wątrobie, mózgu, nerkach i w mięśniach szkieletowych. Bardziej specyficzny tkankowo wydaje się FATP 6, gdyż jego obecność stwierdzono wyłącznie w mięśniu sercowym [2–11].

Kolejnym białkiem biorącym udział w transporcie WKT jest translokaza kwasów tłuszczowych (FAT/CD36). Białko to ma masę 88 kDa i jest zakotwiczone w strukturze podwójnej błony lipidowej komórek mięśniowych za pomocą przynajmniej dwóch domen [12]. Jest to białko o nieselektywnym miejscu występowania w organizmie ludzkim. Stwierdzono, że FAT/CD36 występuje na powierzchni wielu typów komórek, np. płytek krwi, komórek hematopoetycznych, makrofagów, adipocytów, komórek śródbłonka naczyńowego, komórek dendrytycznych, komórek nabłonka barwnikowego siatkówki, miocytów oraz kardiomiocytów. Badania analizujące strukturę tego transportera wykazały także 85-proc. homologię z ludzką glikoproteiną IV [13–21]. Badania przeprowadzane przy pomocy mikroskopii konfokalnej lub przy zastosowaniu frakcjonowania subkomórkowego z wyodrębnieniem poszczególnych struktur wewnątrzkomórkowych dowiodły istnienia FAT/CD36 nie tylko w obrębie błony komórkowej, ale także w przedziale wewnątrzkomórkowym, między innymi w endosomach czy w błonach mitochondrialnych [22–27].

Kolejne białko (FABPpm) biorące udział w transporcie WKT do wnętrza miocytów umiejscowione jest całkowicie po zewnętrznej stronie błon plazmatycznych [28]. Jest to transporter o najmniejszej masie (40 kDa) spośród poznanych przenośników WKT [12]. Dowiedziono, że białko to występuje w większości tkanek czynnie metabolizujących kwasy tłuszczowe [29–33]. Ponadto udowodniono, że identyczna sekwencja aminokwasów występuje w FABPpm i mitochondrialnej aminotransferazie asparaginianowej (mAspAt). Wspomniana powyżej homologia tłumaczy wewnątrzmitochondrialne występowanie tego przenośnika [34].

Udział białkowych transporterów w transporcie kwasów tłuszczowych

Pierwsze doniesienia opisujące transport wspomagany WKT odnoszą się do określenia tempa nasycenia kinetyki przechodzenia kwasu palmitynowego do wnętrza komórek. Stwierdzono wówczas, że podczas transportu kwasu palmitynowego dochodzi do stopniowego wysycenia tego procesu i tempo przechodzenia przez błonę komórkową maleje, mimo zachowanego stale wysokiego gradientu stężeniowego. Jednocześnie stwierdzono, że obniżenie temperatury i/lub dodanie niespecyficznych inhibitorów białek błonowych powoduje także spadek transportu kwasu palmitynowego do wnętrza komórek. Doświadczenia te wykazały obecność przenośników w błonie komórkowej, a w kolejnych badaniach poznano poszczególne białka błonowe biorące udział w tym procesie. Istotne okazało się także stworzenie modelu dużych pęcherzyków sarkolemalnych (*giant sarcolemmal vesicle*), co umożliwiło uzyskanie modelu doświadczalnego pozbawionego metabolizmu WKT, a tym samym precyzyjne określenie ilości przemieszczonych WKT w poprzek błony komórkowej [35]. Uzyskane pęcherzyki sarkolemalne zawierają w błonie plazmatycznej duże ilości FAT/CD36 oraz FABPpm, a wewnątrz znaczne ilości akceptorów WKT, czyli białek wiążących kwasy tłuszczowe (FABPc). Pęcherzyki te są natomiast pozbawione mitochondriów (brak metabolizmu WKT). Badania prowadzone z zastosowaniem tegoż modelu wykazały, że wraz ze wzrostem ilości błonowej FAT/CD36 i FABPpm w strukturze tych pęcherzyków dochodzi także do wzrostu transportu kwasu palmitynowego. Innymi słowy, doświadczenia te doprowadziły do ustalenia silnej zależności między nasileniem ekspresji błonowej białkowych transporterów WKT a następczym zwiększeniem transportu kwasu palmitynowego.

Kolejne badania wykazały podobną zależność między stopniem ekspresji tkankowej FABPpm, jak i FAT/CD36 a stopniem utleniania WKT w poszczególnych tkankach i narządach [36]. Zależność między ilością przenośników w błonie zewnątrzkomórkowej a stopniem transportu była obserwowana także w odniesieniu do FATP 1 i FATP 4 [37, 38]. Największą ekspresję przenośników i największy transport WKT obserwowano w mięśni sercowym, a następnie, odpowiednio mniejszą ekspresję i transport, w mięśniach poprzecznie prążkowanych: czerwonych i białych [35, 36, 39].

Metabolizm kwasów tłuszczowych wewnątrz komórek mięśniowych

Kwasy tłuszczowe krążące w przedziale naczyniowym są połączone z albuminami, a naj-

częściej stanowią cząsteczki składowe triacylogliceroli (TG) we frakcjach lipidowych osocza LDL, HDL, VLDL. Krążące w naczyniach krwionośnych cząsteczki kwasów tłuszczowych początkowo ulegają odłączeniu od białek transportujących je w osoczu. Tylko wolne kwasy tłuszczowe biorą udział w tworzeniu gradientu stężeń w poprzek błony komórkowej. Niezwiązane WKT mogą przemieścić się w poprzek błony lipidowej do wnętrza komórki na drodze transportu biernego lub za pośrednictwem przenośników białkowych, także zgodnie z gradientem stężeń.

Niezwiązane wolne kwasy tłuszczowe mogą połączyć się bezpośrednio z sarkolemą komórek mięśniowych, a dokładniej z częścią hydrofobową przenośnika FATP lub alternatywnie połączyć się pośrednio z tą samą podjednostką tego białka, lecz przy współudziale FAT/CD36 [5]. Tak połączone cząsteczki białkowego przenośnika i kwasu tłuszczowego przemieszczają się do wnętrza komórki na zasadzie mechanizmu flip-flop. Po przemieszczeniu się do wnętrza komórki kwasy tłuszczowe ulegają aktywacji, czego efektem jest połączenie długołańcuchowego kwasu tłuszczowego z cząsteczką acylo-koenzymu A (acylo-CoA). Powstanie tego związku jest katalizowane przez enzym wewnątrzkomórkowy syntetazę acylo-CoA lub przez sam przenośnik FATP. Uczestnictwo białkowego przenośnika WKT w powstawaniu acylo-CoA jest możliwe w momencie jednoczesnego połączenia z nim wolnych kwasów tłuszczowych oraz ATP (z seryną w pozycji 250) [41–43], gdyż jak udowodniono w licznych badaniach, FATP wykazuje jednocześnie aktywność enzymatyczną. Następnie cząsteczki acylo-CoA ulegają połączeniu z białkiem cytoplazmatycznym ACBP (*acylo-CoA Binding Protein*) w stosunku 1:1 i mogą być kierowane na tok przemian w inne frakcje lipidowe (estryfikacja) lub w kierunku utleniania [44]. Należy podkreślić, że po przejściu przez błony komórkowe WKT łączą się z FABPc lub ulegają opisanej wcześniej aktywacji do acylo-CoA i połączeniu z ACBP. Połączenia wewnątrzkomórkowych wolnych kwasów tłuszczowych z białkami cytoplazmatycznymi lub połączenie z syntetazą acylo-CoA we wnętrzu komórki mięśniowej powodują obniżenie stężenia kwasów tłuszczowych tworzących gradient dokomórkowy WKT.

Wolne, osoczowe kwasy tłuszczowe mogą także połączyć się z przenośnikami FABPpm lub FAT/CD36 obecnymi w błonie miocytów. Jeżeli dojdzie do połączenia z cząsteczkami FABPpm pełniącymi funkcję receptorową dla kwasów tłuszczowych, dochodzi do bezpośredniego przeniesienia WKT na drodze flip-flop. Inną możliwością jest połączenie się WKT bezpośrednio z FAT/CD36 i sekwencja zdarzeń się powtarza. Opisa-

no również mechanizm „przekazywania WKT” z FAT/CD36 na FABPpm. Oznacza to możliwość interakcji między poszczególnymi przenośnikami, być może nawet formowania struktur współpracujących w transporcie WKT do wnętrza komórek. Obecność takiego systemu sugerują badania na izolowanych kardiomiocytach, w których na poziomie błony komórkowej wykazano fizyczne połączenia FAT/CD36 i FABPpm. Obecnie trwają intensywne badania mające ustalić, czy istnieje jeden system przezbłonowego transportu wspomagającego WKT, w którym biorą udział wszystkie białkowe transportery kwasów tłuszczowych. Jednak wiele wskazuje na to, że każdy z transporterów WKT działa w sposób niezależny [45].

Podstawowe substraty energetyczne mięśni szkieletowych wykorzystywane w trakcie wysiłku fizycznego

Uzyskiwana przez komórki energia jest wykorzystywana do podtrzymywania czynności życiowych, na które składają się wielokierunkowe reakcje enzymatyczne oraz aktywność systemów transportowych wewnątrzkomórkowych, jak i zachodzących w poprzek błony komórkowej. Jednakże komórki mięśniowe zużywają energię (ATP, adenosynotrójfosforan) przede wszystkim podczas aktywności białek kurczliwych (aktyny i miozyny), a dokładniej podczas zginania główek miozynowych połączonych z nitkami aktynowymi, w procesie skracania się sarkomeru. Niemniej jednak ATP jest zużywane bardzo szybko (kilka sekund skurczu), więc jego zasoby muszą być stale odnawiane. Do resyntezy ATP zużywane są substraty energetyczne, najczęściej w postaci węglowodanów oraz wolnych kwasów tłuszczowych. Glukoza może podlegać przemianom zarówno tlenowym (bardziej wydajnym energetycznie), jak i beztlenowym (mniej wydajnym energetycznie, ale zachodzącym przy braku odpowiednich dostaw tlenu). Długołańcuchowe kwasy tłuszczowe ulegają jedynie procesom oksydacji (w obecności znacznych ilości tlenu), ale dostarczają więcej ATP niż utlenianie glukozy. Kwasy tłuszczowe są najefektywniej wykorzystywane podczas długotrwałej pracy mięśni o średniej lub niskiej intensywności, poniżej progu mleczanowego. W tych bowiem warunkach zapotrzebowanie komórek mięśniowych na substraty energetyczne i tlen jest w pełni pokrywane. Podczas długotrwałych wysiłków fizycznych o intensywności do 50% VO_{2max} wykorzystanie WKT wzrasta, natomiast po przekroczeniu tej wartości udział tłuszczów w pozyskiwaniu ATP się zmniejsza. Wzrost intensywności wysiłku fizycznego ponad wartość progu mleczanowego powoduje wzrost syntezy ATP pozyskiwanego z glukozy pochodzącej z hydrolizy glikogenu

wewnątrzmięśniowego (do momentu natężenia wysiłku o wartości 100% VO_{2max} , kiedy ATP jest pozyskiwane wyłącznie z tego substratu). Jeszcze raz należy podkreślić, że przyczyną takiej dynamiki zmian torów metabolicznych w syntezie ATP jest różna, w zależności od intensywności wysiłku, dostępność tlenu do przemian metabolicznych w obrębie komórki mięśniowej. Ponadto źródło resyntezy ATP zależy także od rodzaju włókien mięśniowych. Mięśnie szkieletowe składają się bowiem z włókien mięśniowych o różnej zdolności utleniania albo glukozy (tzw. włókna szybko kurczące się glikolityczne, białe), albo kwasów tłuszczowych (tzw. włókna tlenowe wolno kurczące się, czerwone) [12].

Udział białek transportujących kwasy tłuszczowe w metabolizmie lipidów w trakcie wysiłku fizycznego w miocytach

Wraz z czasem trwania wysiłku fizycznego dochodzi do wzmożonej aktywacji układu współczulnego. Zwiększenie uwalniania katecholamin obserwowane podczas wysiłku fizycznego jest czynnikiem stymulującym lipolizę tkanki tłuszczowej, co prowadzi do zwiększenia puli kwasów tłuszczowych dostarczanych do krwiobiegu. Zwiększone stężenie kwasów tłuszczowych w osoczu jest przyczyną wzrostu gradientu stężeń WKT w poprzek błony komórkowej miocytów. Wzrost gradientu stężeń w poprzek błony komórkowej predysponuje do nasilenia transportu kwasów tłuszczowych do wnętrza kurczących się miocytów. Czy w takich warunkach zmiany zachodzą także w transporcie wspomaganym? Okazuje się, że tak, a niezależne doniesienia wskazują, że podstawowym, o zmieniającej się ekspresji, transporterem WKT w mięśniach poddawanych wysiłkowi fizycznemu jest FAT/CD36. Podczas wzmożonej aktywności skurczowej dochodzi bowiem do zwiększenia ilości przede wszystkim FAT/CD36 w błonie komórkowej, wzrost ten bardzo dobrze koreluje z nasileniem tempa transportu WKT do wnętrza kurczących się miocytów [51–54]. Choć udowodniono, że FABPpm ma zdolność przemieszczania się podczas skurczów sznurzego mięśnia brzuchatego łydki wywołanych stymulacją elektryczną (100 Hz, 3 sekundy, 10–20 V) nerwu kulszowego [53]. Niemniej jednak należy podkreślić, że nie wszystkie grupy badawcze opisują możliwość przemieszczania się FABPpm do błony komórkowej komórek mięśniowych [52]. Konkretnie mechanizmy wyzwalamy przemieszczanie się wewnątrzkomórkowe FAT/CD36 czy też FABPpm ciągle pozostają nie do końca poznane. Prawdopodobny jest udział aktywacji kaskady kinaz zależnych od AMP (AMPK), która jest aktywowana spadkiem zawartości ATP i wzrostem

AMP, zjawiska te są nasilone podczas wysiłku fizycznego. Aktywacja kaskady kinaz zależnych od AMP (AMPK) skutkuje między innymi aktywacją białka AS160 oraz szeregu białek Rab, które nasilają procesy przemieszczania się pęcherzyków wewnątrz cytoplazmatycznych zawierających transportery kwasów tłuszczowych do błony komórkowej. Podobnie aktywacja kinazy MAPK, także aktywnej podczas czynności skurczowej, jest prawdopodobnie zaangażowana w translokację FAT/CD36 [52, 55]. Ponadto dowiedziono, że farmakologiczne zwiększenie aktywności kinazy C (PKC) w kardiomiocytach wywołuje przemieszczenie FAT/CD36 z przedziału wewnątrzkomórkowego do błony zewnątrzkomórkowej miocytów, co sugeruje udział wapnia w całym procesie [56].

W badaniach przeprowadzonych na szczu-
rzach mięśniach szkieletowych dowiedziono tak-
że istnienia związku między nasileniem i inten-
sywnością wysiłku fizycznego a wzrostem tempa
transportu WKT do wnętrza miocytów. W jednym
z pierwszych doświadczeń porównano zarów-
no tempo transportu WKT, jak i ekspresję białek
transportujących wolne kwasy tłuszczowe w mięs-
niach stymulowanych elektrycznie do nasilonej
czynności skurczowej i w mięśniach odnerwio-
nych. Udowodniono, że w mięśniach kurczących
się doszło do wzrostu zawartości zarówno FAT/
/CD36 (+43%), jak i FABPpm (+30%) znajdu-
jących się w błonie komórkowej w porównaniu
z mięśniami odnerwionymi. Ponadto stwierdzo-
no istnienie pozytywnej korelacji wyższej eks-
presji FAT/CD36 i FABPpm ze zwiększeniem
się transportu WKT w kurczących się mięśniach.
Interesujące było także stwierdzenie, że całkowi-
ta pula miocytarnych białkowych przenośników
WKT (FAT/CD36 i FABPpm) nie uległa zmianie
w badanych tkankach [40]. Powyższe doniesienia
pozwoliły stwierdzić, że wzrost dokomórkowego
transportu WKT obserwowany podczas wysiłku
fizycznego jest spowodowany zwiększeniem się
puli białkowych przenośników wyłącznie w struk-
turze błony komórkowej przy niezmienionej ich
całkowitej liczbie. Uzyskane w tym doświadcze-
niu informacje pozwoliły stwierdzić istotny wpływ
wysiłku fizycznego na nasilenie transportu kwasu
palmitynowego wspomaganego zwiększoną eks-
presją FAT/CD36 i FABPpm. Obecnie nie zostały
wykazane podobne zależności odnośnie do wpły-
wu wysiłku fizycznego na ekspresję innego prze-
nośnika WKT, a mianowicie FATP [37, 38, 46].

Udział transporterów FAT/CD36 i FABPpm
w metabolizmie mięśniowym podczas wysiłku fi-
zycznego potwierdzono także w doświadczeniach
przeprowadzonych na mięśniach szkieletowych
ludzi. Wykazano, że podczas 3–8-tygodniowe-

go treningu, o intensywności między 70% a 90%
VO₂max i trwającego 1–2 godziny dziennie
u ludzi dochodzi do zwiększenia puli miocytar-
nej białek zarówno FAT/CD36, jak i FABPpm
[47]. Wykazano także, że już po 9 dniach ćwi-
czeń trwających 1 godzinę dziennie, o natężeniu
60% VO₂max dochodzi do znacznego wzrostu
utleniania WKT, który bardzo silnie koreluje – ze
wzrostem ekspresji błonowej FAT/CD36. Znac-
nie mniej jest doniesień potwierdzających udział
FABPpm w zwiększaniu dostaw kwasów tłuszc-
zowych do mięśni podczas wysiłku fizycznego
[48]. W jednym z doświadczeń stwierdzono jedy-
nie, że wysiłek fizyczny w postaci 10 powtórzeń
bardzo intensywnego biegu o wartości 90–150%
VO₂max spowodował istotne zwiększenie utlenia-
nia WKT z towarzyszącym zwiększeniem ekspre-
sji FABPpm w miocytach mięśni szkieletowych.
Żeby uzyskać takie zmiany w metabolizmie, wy-
starczyło zaledwie 7 sesji ćwiczeniowych prze-
prowadzonych w ciągu ponad 2 tygodni [49].

Innym zagadnieniem jest udział białkowych
transporterów WKT w procesie przechodzenia ak-
tywnych form kwasów tłuszczowych (acylo-CoA)
do wnętrza mitochondriów. Jest to istotne tym bar-
dziej, że regularny wysiłek fizyczny sprzyja bio-
geniezie mitochondriów, rośnie także aktywność
enzymów macierzy mitochondrialnej i tempo ok-
sydacji kwasów tłuszczowych. Wiadomo także, że
ze względu na bipolarność cząsteczki acylo-CoA
nie mogą swobodnie przechodzić przez błonę mi-
tochondrialną do grzebieni mitochondrialnych,
które są miejscem utleniania. Istnieje więc system
przenoszący acylo-CoA do mitochondriów związa-
ny z ich estryfikacją z karnityną w reakcji katalizo-
wanej przez acylotransferazę karnitynową (CPTI)
[57]. U szczurów aktywność CPTI jest alloster-
ycznie hamowana przez malonylo-CoA. Podczas
czynności skurczowej mięśni dochodzi do obniże-
nia stężenia malonylo-CoA, tym samym dochodzi
do zmniejszenia procesu hamowania CPTI. Wzrost
aktywności CPTI oznacza więc nasilenie transpor-
tu acylo-CoA do wnętrza mitochondriów miocytów
i wzrost utleniania WKT [58]. Czy w procesie prze-
mieszczania się cząsteczek acylo-CoA przez błony
mitochondrialne biorą udział także białka trans-
portujące kwasy tłuszczowe? Dotychczas przepro-
wadzono niewiele badań dotyczących poznania
alternatywnego sposobu przenikania substancji li-
pidowych do wnętrza mitochondriów. Część bada-
czy uważa, że w transport WKT zaangażowane są
również białkowe transportery kwasów tłuszczo-
wych: FAT/CD36 oraz FABPpm, których ekspresję
stwierdzono w izolowanych mitochondriach mięśni
szkieletowych [59–61]. Udowodniono także istotną
korelację ($r=0,63$) między mitochondrialną ekspre-
sją FAT/CD36 a nasileniem tempa utleniania kwa-

su palmitynowego. To doświadczenie zostało przeprowadzone na wyizolowanych mitochondriach mięśni szkieletowych uprzednio stymulowanych elektrycznie do skurczu [26]. Zaobserwowano również tendencję do wzrostu ilości mitochondrialnego FAT/CD36 wraz z czasem trwania wysiłku fizycznego. Udział FAT/CD36 w transporcie WKT do mitochondriów potwierdzają także badania stwierdzające, że po zastosowaniu (SSO) specyficznego inhibitora FAT/CD36 dochodzi do zmniejszenia transportu związków tłuszczowych do wnętrza mitochondriów [23]. Wzrost ekspresji mitochondrialnego FAT/CD36 podczas wysiłku fizycznego był obserwowany również w mięśniach szkieletowych ludzi. Po dwugodzinnym wysiłku (jazda na rowerze o intensywności 60% VO_2 max) wraz ze wzrostem procesu oksydacji WKT zauważono wzrost ekspresji mitochondrialnego FAT/CD36 [26]. Natomiast badania poświęcone FABPpm nie wykazały zmian ekspresji mitochondrialnej tego białka. Doświadczenia polegające na 30-minutowej stymulacji elektrycznej mięśnia poprzecznego prądkowanego, jak i 2-godzinnej jeździe rowerem o intensywności 60% VO_2 max nie wykazały istotnego statystycznie wzrostu puli mitochondrialnego FABPpm [62]. Należy jednakże pamiętać, że podczas analizy struktury FABPpm dowiedziono, iż wykazuje ono homologię z mAspAT [63], co utrudnia interpretację tychże doniesień. Prawdopo-

dobnie na poziomie błon komórkowych FABPpm uczestniczy w transporcie WKT do wnętrza miocytów, ale na poziomie mitochondrialnym FABPpm jest włączane w transport NADH przez mitochondrialne błony [62], a nie uczestniczy w transporcie przez błony mitochondrialne.

Podsumowując powyższe doniesienia, można stwierdzić, że podstawowym transporterem WKT wydaje się być FAT/CD36. Ekspresja błonowa tego białka jest ściśle związana z transportem dokomórkowym WKT, co podczas wysiłku fizycznego zapewnia odpowiednio zwiększone dostawy WKT do kurczących się miocytów. Interesujące wydają się także doniesienia o udziale FAT/CD36 w procesie przechodzenia acylo-CoA do wnętrza mitochondriów, co ma szczególne znaczenie podczas wysiłku fizycznego w trakcie nasilonych procesów oksydacji WKT. Niestety, rola pozostałych białkowych transporterów kwasów tłuszczowych (FABPpm i FATP) pozostaje słabo poznana.

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Adrian Chabowski
Zakład Fizjologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2c
tel.: (85) 748-55-88
e-mail: adrian@umwb.edu.pl

Piśmiennictwo:

1. Stahl A., Gimeno R., Tartaglia L., Lodish H.: Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol. Metab.* 2001, 12: 266-273.
2. Schaffer J., Lodish H.: Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 1994, 79: 427-436.
3. Stahl A., Gimeno R., Tartaglia L., Lodish H.: Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2001, 12: 266-273.
4. Hirsch D., Stahl A., Lodish H.: A Family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95: 8625-869.
5. Stahl A., Hirsch D., Gimeno R. et al.: Identification of major intestinal fatty acid transport protein. *Mol. Cell.* 1999, 4: 299-308.
6. Fitscher B., Riedel H., Young K., Stremmel W.: Tissue distribution and cDNA cloning of a human fatty acid transport protein (hsFATP4). *Biochem. Biophys. Acta* 1998, 1443: 381-385.
7. Berger J., Truppe C., Neumann H., Forss-Petter S.: A novel relative of the very-long-chain acyl-CoA synthetase and fatty acid transporter protein genes with a distinct expression pattern. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 247: 255-260.
8. Watkins P., Pevsner J., Steinberg S.: Human very long-chain acyl-CoA synthetase and two human homologs: initial characterization and relationship to fatty acid transport protein. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 1999, 60: 323-328.
9. Goré J., Hoinard C.: Linolenic acid transport in hamster intestinal cells is carrier-mediated. *J. Nutr.* 1993, 123: 66-73.
10. Stremmel W.: Mechanism of hepatic fatty acid uptake. *J. Hepatol.* 1989, 9: 374-382.
11. Steinberg S., Wang S., McGuinness M., Watkins P.: Human liver-specific very-long chain acyl-coenzyme A synthetase: cDNA cloning and characterization of second enzymatically active protein. *Mol. Genet. Metab.* 1999, 68: 32-42.
12. Holloway G., Luiken J., Glatz J. et al.: Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview. *Acta Physiol.* 2008, 194: 293-309.
13. Abumrad N., El-Maghrabi M., Amri E. et al.: Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long chain-fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J. Biol. Chem.* 1993, 268: 17665-17668.
14. Endemann G., Stanton L., Madden K. et al.: CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 1993, 268: 11811-11816.
15. Febbraio M., Hajjar D., Silverstein R.: CD36 a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* 2001, 108: 785-791.
16. Greenwalt D., Lipsky R., Ockenhouse C. et al.: Membrane glycoprotein CD36:

a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 1992, 80: 1105-1115. **17.** Greenwalt D., Mather I.: Characterization of an apically derived epithelial membrane glycoprotein from bovine milk, which is expressed in capillary endothelia in diverse tissue. *J. Cell. Biol.* 1985, 100: 397-408. **18.** Nicholson A.: Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPAR γ signaling. *Trends Cardiovasc. Med.* 2004, 14: 8-12. **19.** Nicholson A., Hajjar D.: CD36, oxidized LDL and PPAR γ : pathological interactions in macrophages and atherosclerosis. *Vascul. Pharmacol.* 2004, 41: 139-146.

20. Ryeom S., Sparrow J., Silverstein R.: CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J. Cell. Sci.* 1996, 109: 387-395. **21.** Swerlick R., Lee K., Wick T., Lawley T.: Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J. Immunol.* 1992, 148: 78-83. **22.** Bandyopadhyay G., Yu J., Ofrecio J., Olefsky J.: Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis, thiazolidinedione treatment reverses these defects. *Diabetes* 2006, 55: 2277-2285. **23.** Campbell S., Tandon N., Woldegiorgis G. et al.: A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2004, 279: 36235-36241. **24.** Yoshida Y., Holloway G., Ljubcic V. et al.: Negligible direct lactate oxidation in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria obtained from red and white rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 2007, 582: 1317-1335.

25. Bezaire V., Bruce C., Heigenhauser G. et al.: Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006, 290: E509-E515. **26.** Holloway G., Bezaire V., Heigenhauser G. et al.: Mitochondrial long chain fatty acid oxidation, fatty acid translocase/CD36 content and carnitine palmitoyltransferase I activity in human skeletal muscle during aerobic exercise. *J. Physiol.* 2006, 571: 201-210. **27.** Holloway G., Thrush A., Heigenhauser G. et al.: Skeletal muscle mitochondrial FAT/CD36 content and palmitate oxidation are not decreased in obese women. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007, 292: E1782-E1789. **28.** Stump D., Zhou S., Berk P.: Comparison of plasma membrane FABP and mitochondrial isoform of aspartate aminotransferase from rat liver. *Am. J. Physiol.* 1993, 265: G894-G902. **29.** Berk P., Bradbury M., Zhou S., Stump D. et al.: Characterization of membrane transport processes: lessons from the study of BSP, bilirubin, and fatty acid uptake. *Semin. Liver Dis.* 1996, 16: 107-120.

30. Berk P., Zhou S., Kiang C. et al.: Uptake of long chain fatty acid is selectively up-regulated in adipocytes of Zucker rats with genetic obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 8830-8835. **31.** Bonen A., Miskovic D., Kiens B.: Fatty acid transporters (FABPpm, FAT, FATP) in human muscle. *Can. J. Appl. Physiol.* 1999, 24: 515-523. **32.** Turcotte L., Srivastava A., Chiasson J.: Fasting increases plasma membrane fatty acid binding (FABPpm) in red skeletal muscle. *Mol. Cell. Biochem.* 1997, 166: 153-158. **33.** Turcotte L., Swenberger J., Tucker M. et al.: Muscle palmitate uptake and binding are saturable and inhibited by antibodies to FABP(PM). *Mol. Cell. Biochem.* 2000, 210: 53-63. **34.** Cechetto J., Sadacharan S., Berk P., Gupta R.: Immunogold localization of mitochondrial aspartate aminotransferase in mitochondria and on the cell surface in normal rat tissues. *Histol. Histopathol.* 2002, 17: 353-364.

35. Luiken J., Turcotte L., Bonen A.: Protein – mediated palmitate uptake and expression of fatty acid transport proteins in heart giant vesicles. *J. Lipid Res.* 1999, 40: 1007-1016. **36.** Bonen A., Luiken J., Liu S. et al.: Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles. *Am. J. Physiol.* 1998, 275: E471-E478. **37.** Kim J., Gimeno R., Higashimori T. et al.: Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 2004, 113: 756-763. **38.** Dirusso C., Li H., Darwis D. et al.: Comparative biochemical studies of the murine fatty acid transport proteins (FATP) expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* 2005, 280: 16829-16837. **39.** Visten B., Roepstorff K., Roepstorff C. et al.: Sarcolemmal FAT/CD36 in human skeletal muscle colocalizes with caveolin – 3 and is more abundant in type 1 than in type 2 fibers. *J. Lipid. Res.* 2004, 45: 603-609.

40. Koonen D., Benton C., Arumugam Y. et al.: Different mechanisms can alter fatty acid transport when muscle contractile activity is chronically altered. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004, 286: E1042-E1049. **41.** Coe N., Smith A., Frohnert B. et al.: The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase. *J. Biol. Chem.* 1999, 274: 36300-36304. **42.** Babbitt P., Kenyon G., Martin B. et al.: Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of amino acid sequence identities among families of acyl:adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases. *Biochemistry* 1992, 31: 5594-5604. **43.** Watkins P., Lu J., Steinberg S. et al.: Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* FAT1 gene decreases very long-chain fatty acyl-CoA synthetase activity and elevates intracellular very long-chain fatty acid concentrations. *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 18210-18219. **44.** Glatz J., Schaap F., Binas B. et al.: Cytoplasmic fatty acid-binding protein facilitates fatty acid utilization by skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 2003, 178: 367-371.

45. Stahl A., Gimeno R., Tartaglia L., Lodish H.: Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol. Metab.* 2001, 12: 266-273. **46.** Koonen D., Benton C., Arumugam Y. et al.: Different mechanisms can alter fatty acid transport when muscle contractile activity is chronically altered. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2004, 286: E1042-E1049. **47.** Kiens B., Kristiansen S., Jensen P. et al.: Membrane associated fatty acid binding protein (FABPpm) in human skeletal muscle is increased by endurance training. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 231: 463-465. **48.** Tunstall R., Mehan K., Wadley G. et al.: Exercise training increases lipid metabolism gene expression in human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002, 283: E66-E72. **49.** Talanian J., Galloway S., Heigenhauser G. et al.: Two weeks of high-intensity aerobic interval training increases the capacity for fat oxidation during exercise in women. *J. Appl. Physiol.* 2007, 102: 1439-1447.

50. Burgomaster K., Cermak N., Phillips S. et al.: Divergent response of metabolite transport proteins in human skeletal muscle after sprint interval training and detraining. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007, 292: R1970-R1976. **51.** Bonen A., Luiken J., Arumugam Y. et al.: Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J. Biol. Chem.* 2000, 275: 14501-14508. **52.** Luiken J., Coort S., Willems J. et al.: Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes* 2003, 52: 1627-1634. **53.** Han X., Chabowski A., Tandon N. et al.: Metabolic challenges reveal impaired fatty acid metabolism and translocation of FAT/CD36 but not FABPpm in obese Zucker rat muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007, 293: E566-E575. **54.** Turcotte L., Raney M., Todd M.: ERK1/2 inhibition prevents contraction-induced increase in plasma membrane FAT/CD36 content and FA uptake in rodent muscle. *Acta Physiol. Scand.* 2005, 184: 131-139.

55. Chabowski A., Coort S., Calles-Escandon J. et al.: The subcellular compartmentation of fatty acid transporters is regulated differently by insulin and by AICAR. *Febs. Lett.* 2005, 579: 2428-2432. **56.** Luiken J., Coort S., Koonen D. et al.: Signaling components involved in contraction-inducible substrate uptake into cardiac myocytes. *Proc. Nutr. Soc.* 2004, 63: 251-258. **57.** Mc Garry J., Brown N.: The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem.* 1997, 244: 1-14. **58.** Winder W., Arogyasami J., Elayan I., Cartmill D.: Time course of exercise-induced decline in malonyl-CoA in different muscle types. *Am. J. Physiol.*

1990, 259: E266-E271. **59.** Campbell S., Tandon N., Woldegiorgis G. et al.: A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2004, 279: 36235-36241.

60. Berk P., Wada H., Horio Y. et al.: Plasma membrane fatty acid-binding protein and mitochondria glutamic-oxaloacetic transaminase of rat liver are related. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87: 3484-3488. **61.** Stump D., Zhou S., Berk P.: Comparison of plasma membrane FABP and mitochondrial isoform of aspartate aminotransferase from rat liver. *Am. J. Physiol* 1993, 265: G894-G902. **62.** Holloway G., Lally J., Nickerson J. et al.: Fatty acid binding protein facilitates sarcolemmal fatty acid transport but not mitochondrial oxidation in rat and human skeletal muscle. *J. Physiol.* 2007, 582: 393-405. **63.** Stump D., Zhou S., Berk P.D.: Comparison of plasma membrane FABP and mitochondrial isoform of aspartate from rat liver. *Am. J. Physiol.* 1993, 265: G894-G902.

FoxO – BIAŁKA TRANSKRYPCYJNE O SZEROKICH MOŻLIWOŚCIACH METABOLICZNYCH. BUDOWA, REGULACJA, METABOLIZM

**FOXO – TRANSCRIPTION PROTEIN WITH BROAD METABOLIC
CAPABILITIES. STRUCTURE, REGULATION, METABOLISM**

Streszczenie

W artykule opisano budowę, mechanizmy regulacji aktywności oraz funkcje metaboliczne FoxO. FoxO należy do rodziny białkowych czynników transkrypcyjnych o złożonej budowie i rozbudowanych funkcjach. FoxO uczestniczą bezpośrednio lub pośrednio w wielu szlakach metabolicznych, m.in. w metabolizmie glukozy, regulacji stresu oksydacyjnego, cyklu komórkowym, różnicowaniu komórkowym, procesach nowotworzenia, apoptozie komórki. FoxO pełnią swoją funkcję poprzez modulowanie ekspresji genów zaangażowanych w wyżej wymienione procesy. Spośród modyfikacji, jakim ulega FoxO, należy wymienić: interakcje typu białko-białko, modyfikacje potranslacyjne (tym fosforylację, acetylację) oraz modyfikacje z udziałem ubikwityny. W prezentowanej pracy postaramy się określić współzależność budowy FoxO, jego funkcji oraz wpływu modyfikacji potranslacyjnych na kierunek transkrypcji FoxO.

Słowa kluczowe: FoxO, DAF-16, FKHR, FKHL1, AFX, AKT/PKB, PGC-1 α

Abstract

In this paper structure and mechanisms of activity regulation and metabolic function of FoxO has been described. FoxO protein belongs to a family of transcription factors with a complex structure and a very extensive features. FoxO participate directly or indirectly in many metabolic pathways for eg.: in glucose metabolism, regulation of oxidative stress, cell cycle, cell differentiation, the process of carcinogenesis, to the apoptosis. FoxO play its role by modulating the expression of genes involved in these processes. Among the modifications undergone by the FoxO include: protein-protein interaction, posttranslational modifications (including phosphorylation, acetylation), and modifications involving ubiquitin. In this work we will try to determine the correlation between FoxO structure, its function and the impact of post-translational modifications on the direction of FoxO transcription.

Key words: FoxO, DAF-16, FKHR, FKHL1, AFX, AKT/PKB, PGC-1 α

FoxO – charakterystyka ogólna

FoxO są rodziną białkowych czynników transkrypcyjnych. Pierwsze informacje na temat FoxO uzyskano na podstawie badań genomu muszki *Drosophila melanogaster* oraz nicienia z rodzaju *Caenorhabditis elegans*. Już wstępne badania pozwoliły wyodrębnić ponad 100 strukturalnie podobnych do siebie czynników transkrypcyjnych należących do tej rodziny białek [1–4].

Jednym z pierwszych dobrze poznanych i opisanych homologów ludzkiego FoxO było białko DAF-16 wyodrębnione z organizmu *Caenor-*

habditis elegans [4]. Białko to ma wpływ na wiele funkcji życiowych nicienia, ale działaniem dobrze opisanym i fascynującym jest udział DAF-16 w regulacji długości życia nicienia. Ustalono, że w warunkach stresu środowiskowego związanego z niedoborem pożywienia nicien wchodzi w fazę przetrwalnikową (dauer), w której może przetrwać dłużej, niż wynosi normalny cykl życiowy tego bezkręgowca. Za wprowadzenie nicienia w fazę przetrwalnikową odpowiedzialne jest DAF-16, które poprzez regulację aktywności receptora dla insuliny oraz IGF-1 wymusza wejście *C. elegans*

w fazę dauer [4]. Stwierdzono wysoki stopień homologii między międzygatunkowymi homologami FoxO [5]. U ssaków zidentyfikowano wiele białek należących do rodziny FoxO: FoxO1 (FKHR), FoxO3 (FKHRL1), FoxO4 (AFX) oraz FoxO6 [2, 3, 6–8]. Pokrewieństwo jest szczególnie duże w obszarze domen wiążących DNA [5]. Podobieństwa obejmują także działania metaboliczne – ustalono, że FoxO1 (ludzki homolog DAF-16) jest podobnie jak DAF-16 wrażliwy na stężenie insuliny oraz IGF-1 w krążeniu [9].

FoxO – struktura

Wszystkie białka FoxO charakteryzują się podobnym schematem strukturalnym. FoxO1 oraz FoxO3 charakteryzują się podobną długością łańcucha białkowego, zawierającego około 650 reszt aminokwasowych. FoxO4 jest nieco krótszy i zawiera około 500 reszt aminokwasowych [9]. Część białka składa się z czterech domen: czynnika DBD o wysokiej konserwatywności, domeny lokalizacji jądrowej (NLS), sekwencji eksportu do jądra komórkowego (NES) oraz domeny C-terminalnej (TA) [4, 9].

Analiza sekwencji poszczególnych domen FoxO wykazała dużą konserwatywność ich struktury. Najbardziej niezmiennym odcinkiem łańcucha FoxO jest N-terminalny region obejmujący pierwszą kinazę białkową B (PKB), strukturę DBD, region obejmujący NLS oraz część transaktywacyjnej domeny C-terminalnej TA [9]. Co ciekawe, poza sekwencjami o wysokiej konserwatywności strukturalnej, niektóre obszary FoxO charakteryzują się znaczną różnorodnością pod względem struktury, ekspresji oraz funkcji [4].

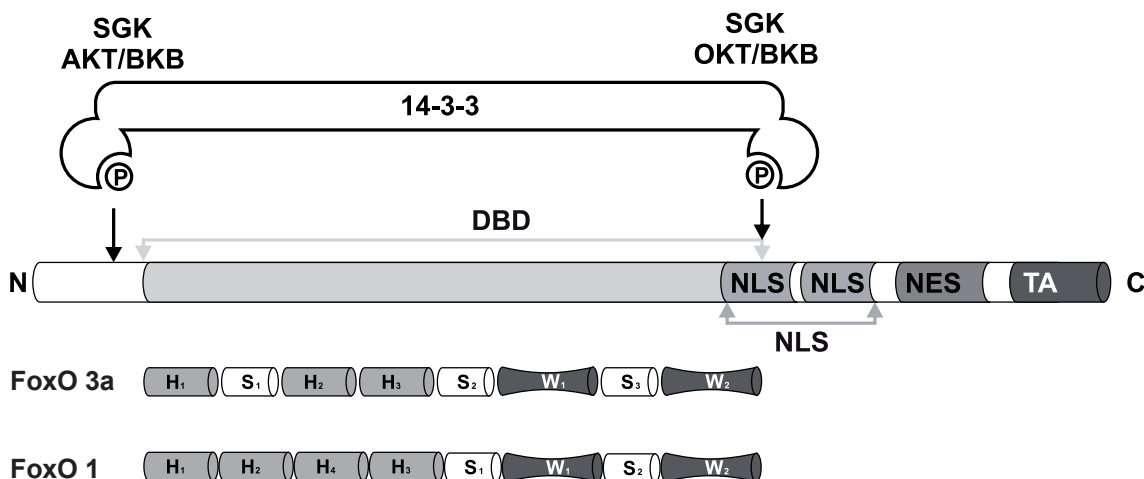
Większość doniesień charakteryzujących strukturę FoxO obejmuje opis dobrze poznanego FoxO3a, który jest białkiem specyficznym dla wątroby – warunkującym m.in. różnicowanie się hepatocytów. Na podstawie badań FoxO3a okre-

ślono charakter tzw. helisy skrzydłowej obecnej w sekwencji wszystkich białek FoxO. Ten element to struktura obejmująca około 110 aminokwasów tworzących trzy α -helisy (H1, H2, H3), trzy β -harmonijki (S1, S2, S3) oraz dwie skrzydłopodobne struktury (W1, W2). Wszystkie elementy ułożone są w specyficznej sekwencji: H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2 [2, 4, 7–9]. Późniejsze badania wykazały obecność drobnych różnic w układzie struktury drugorzędowej białek. Modyfikacje te dotyczą głównie C-terminalnego końca struktury [4, 9].

Mechanizm rozpoznawania DNA przez białka FoxO

Mimo że mechanizmy rozpoznawania sekwencji DNA przez FoxO nie zostały do końca poznane, większość czynników FoxO wykazuje podobną specyficzność rozpoznawczą w kierunku sekwencji DNA. Najczęściej jest to odcinek 5'-(A/C)AA(C/T)A-3' [9]. W zależności od klasy FoxO rozpoznają również sekwencje przyległe do sekwencji głównej [7, 9]. FoxO rozpoznają się i łączą w obrębie sekwencji 5'-GTAAACAA-3', która określana jest jako „DAF-16 sekwencja wiążąca”. Sekwencja ta obejmuje sekwencję główną 5'-(A/C)AA(C/T)A-3' rozpoznawalną dla wszystkich członków rodziny czynników transkrypcyjnych. FoxO rozpoznają również sekwencje insulinowrażliwe obejmujące odcinek 5'(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3' [2, 9]. Sekwencja insulinowrażliwa różni się od DAF-16. Różnica ta polega przede wszystkim na powinowactwie – FoxO potrafią wiązać się z DNA obiema sekwencjami, tymczasem DAF-16 wykazuje silniejsze powinowactwo do specyficznych dla niego sekwencji DNA [9]. Przeprowadzone badania wykazały istnienie wysokiego stopnia homologii w strukturze domen wiążących w obrębie rodziny białek FoxO. Najbardziej konserwatywny region H3 DBD białka FoxO, który jednocześnie stanowi element wiążący z DNA,

Rycina 1. Struktura.



jest najbardziej reaktywnym elementem struktury FoxO. Natomiast regiony bardziej labilne, takie jak N-terminalne sekwencje helisy H1, region pomiędzy H2 i H3, skrzydło W1 i sekwencja C-terminalna, stanowią obszary regulatorowe, umożliwiające rozpoznanie, dopasowanie się oraz wytworzenie kompleksu DBD-DNA [1, 9].

Modyfikacje potranslacyjne FoxO

W związku z szerokim spektrum procesów regulowanych przez FoxO kluczowym zagadnieniem jest poznanie mechanizmów kontroli aktywności tego białka. Jak ustalono, są nimi interakcje typu białko-białko, modyfikacje potranslacyjne (w tym fosforylacja, acetylacja) oraz modyfikacje z udziałem ubikwityny [4, 7–9]. Dokładne mechanizmy wpływu powyższych czynników na funkcje FoxO nie są do końca poznane, jednak w wielu przypadkach wpływają na zdolność wiązania białka z DNA. Modyfikacje potranslacyjne najczęściej zachodzą w miejscach sekwencji najbardziej konserwatywnych [9].

Fosforylacja FoxO przy udziale kinaz białkowych

Kinazy białkowe (PKB) mają zdolność regulowania aktywności czynników transkrypcyjnych [7]. Za aktywację FoxO3a odpowiadają kinaza białkowa PKB (*Protein kinase B*) oraz kinaza SGK (*Serumand glucocorticoid-regulated kinase*). Aktywacja obu jest zależna od aktywności kinazy 3 (PI3K) [3].

Pierwsze informacje o wpływie kinazy białkowej na aktywność FoxO (prowadzone na *C. ele-*

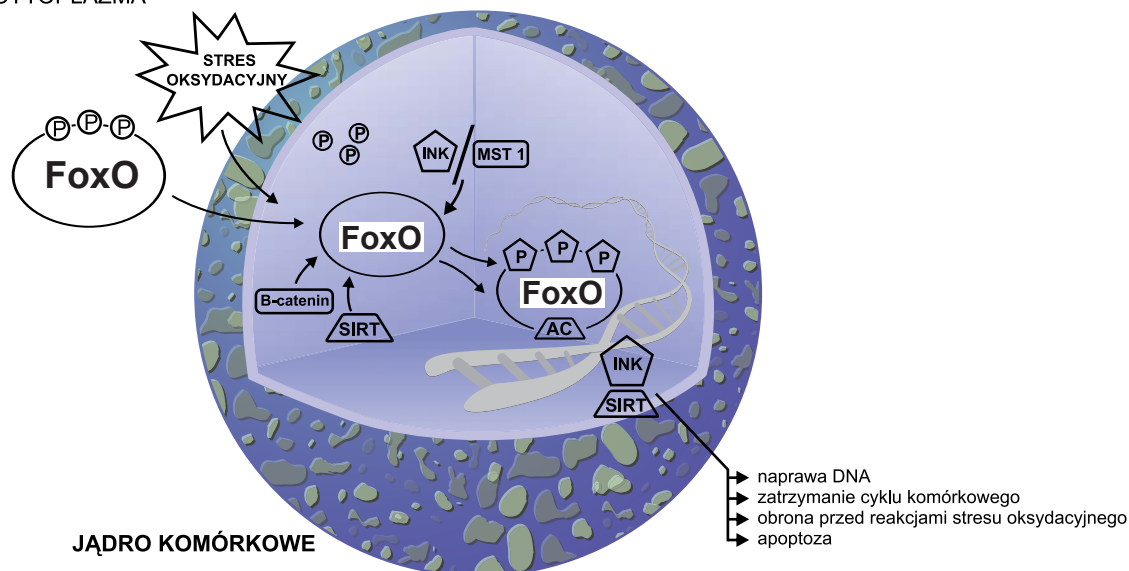
gans) pozwoliły sformułować stwierdzenie, że fosforylacja ogranicza aktywność DAF-16 (homolog FoxO) [3, 7]. Nieufosforylowane FoxO są zlokalizowane w jądrze komórkowym i regulują proces transkrypcji kontrolowanych przez siebie genów. Aktywacja kinazy PKB i fosforylacja FoxO przyczyniają się do inaktywacji tego czynnika transkrypcyjnego i przemieszczenia go z jądra do cytoplazmy [7, 9]. Kinaza PKB może ulec aktywacji np. pod wpływem czynników wzrostu [7, 10].

Fosforylacja FoxO za pomocą kinazy białkowej insulino-fosfatydyloinozytolowej AKT/PKB przebiega nieco inaczej [9]. Aktywacja ścieżki sygnalizacyjnej kinazy 3 AKT/PKB powoduje fosforylację białek FoxO, ich wiązanie ze specyficznym białkiem 14-3-3 oraz usunięcie kompleksu do cytoplazmy [3, 7, 9].

Fosforylacja FoxO z udziałem kinaz białkowych jest ściśle związana z białkiem 14-3-3 [7–9]. Białko 14-3-3 posiada dwa miejsca wiązania z DNA. Pierwsze miejsce wiążące zlokalizowane jest na N-terminalnym końcu cząsteczki. Drugi motyw wrażliwy na inhibicję jest zlokalizowany na C-terminalnym końcu domeny wiążącej za pomocą białek 14-3-3. Oba miejsca wiążące powstają w procesie fosforylacji białka przy udziale kinazy AKT/PKB. W tym regionie białko 14-3-3 hamuje wiązanie FoxO-DNA na dwa sposoby: po pierwsze poprzez maskowanie regionów wiążących FoxO, po drugie poprzez zmianę konformacji głównej domeny wiążącej [9]. Taką inhibicję, zależną od białek 14-3-3, zaobserwowano dla DAF-16 u bezkręgowców oraz dla FoxO4 w organizmach wyższych [1]. Wytworzenie obu motywów 14-3-3 jest

Rycina 2. Aktywacja. Pod wpływem działania stresu oksydacyjnego ulegają uaktywnieniu czynniki koordynujące relokację FoxO w jądrze komórkowym: INK, MST1, SIRT, β -kateniny. Pod wpływem tych czynników dochodzi odpowiednio do fosforylacji i acetylacji FoxO, czego konsekwencją jest zmiana lokalizacji FoxO w jądrze komórkowym. Jest to pozytywna regulacja aktywności FoxO.

CYTOPLAZMA



niezbędne dla prawidłowego wiązania się FoxO z białkami jądrowymi. [7, 9]. Jednak to nie jedyny wpływ białek 14-3-3 na czynnik FoxO. Kompleks FoxO-białko 14-3-3 jest usuwany z jądra do cytoplazmy [3, 7, 9]. Ufosforylowany FoxO łączy się z białkiem 14-3-3 jeszcze w jądrze komórkowym przed przeniesieniem do cytoplazmy [4, 7, 9]. W cytoplazmie kompleks FoxO-białko14-3-3 pozostaje nierozzerwalny, co zapobiega importowi ufosforylowanego FoxO z powrotem do jądra [3, 7, 9]. Dokładny mechanizm tego procesu nie został do końca poznany, jednak wykazano, iż białka 14-3-3 wiążą się z ufosforylowanym FoxO w jądrze. Powstanie tego kompleksu może również powodować zmiany konformacyjne FoxO, prowadząc do zmian w obrębie regionu NES [4, 9].

W rodzinie białek FoxO zidentyfikowano charakterystyczną dwudzielną strukturę NLS. Struktura ta zawiera dwa monodimery określane razem jako NLS. Obydwa monodimery składają się z domen aminokwasowych oddzielonych sekwencją separatorową [6, 9]. NLS w całości obejmuje 12 reszt argininowych i lizynowych rozmieszczonych po obu stronach drugiego motywu wiążącego AKT/14-3-3 na C-terminalnym końcu cząsteczki [9].

Na aktywność FoxO wpływa także kinaza 1 GMP-zależna (cGK1), regulująca aktywność FoxO1 w komórkach mięśniowych. FoxO1 bezpo-

średnio aktywuje transkrypcję cGK1, która następnie fosforyluje sekwencję seryn w FoxO1 [2, 9]. Fosforylacja z udziałem cGK1 powoduje również zmianę lokalizacji FoxO1 – przemieszczenie z jądra do cytoplazmy. Fosforylacja za pomocą cGK1 wydaje się specyficzna dla FoxO1 [1, 9].

Innym enzymem wpływającym na aktywność FoxO jest kinaza MST1 (*oxidative stress-regulated mammalian Ste-20 like kinase-1*). Kinaza MST1 fosforyluje FoxO1 i FoxO3 w wysoko konserwatywnym regionie seryn helisy H3(Ser212, Ser218, Ser234 oraz Ser235) [4]. W efekcie następuje rozzerwanie kompleksu (cytoplazmatycznego) FoxO-białko 14-3-3, co prowadzi do śmierci komórki [4, 9].

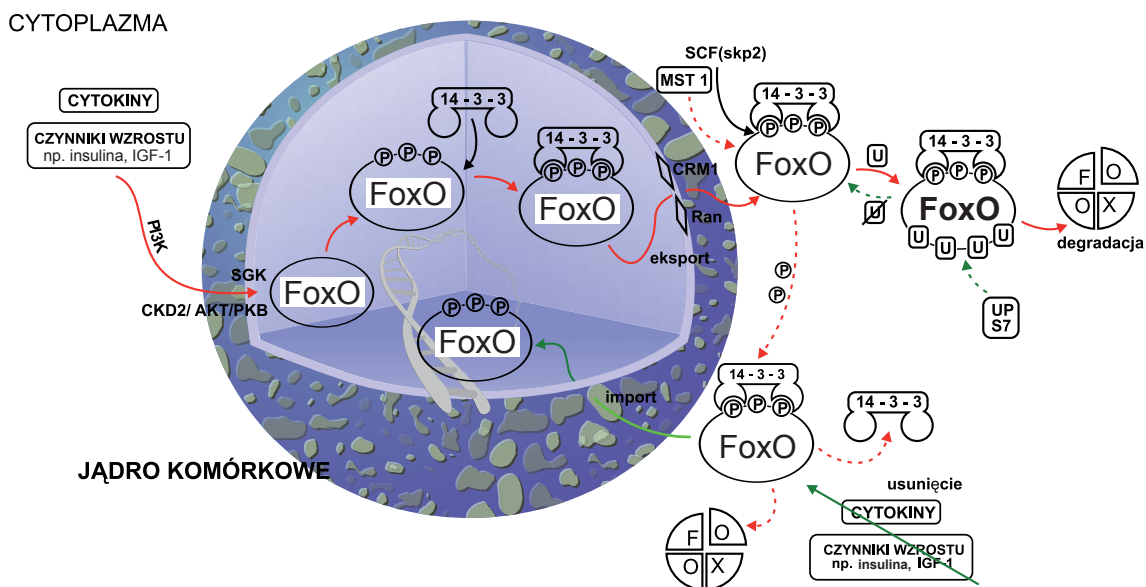
Enzymem fosforylującym FoxO jest również cyklinozależna kinaza-2 CDK 2. Badania wykazały, że ta modyfikacja jest charakterystyczna dla FoxO1 [9].

Acetylacja FoxO

Oprócz fosforylacji kontrola funkcji białka FoxO jest regulowana przez inne rodzaje modyfikacji potranslacyjnych – acetylację, ubikwitynizację [9].

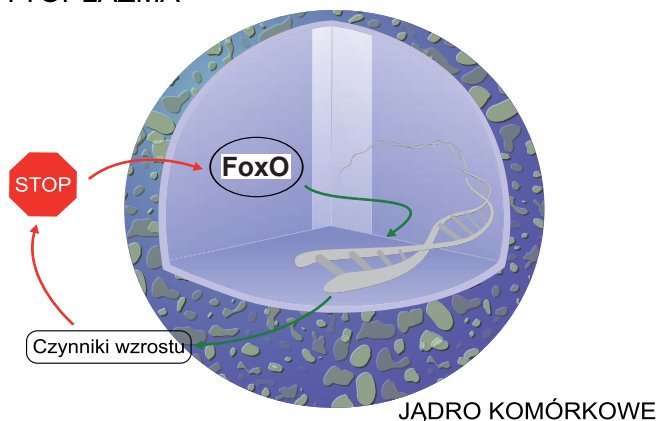
Acetylacja FoxO ma wpływ przede wszystkim na przemieszczanie FoxO do jądra komórkowego. Modyfikacja tego typu może być prowadzona przez acetylotransferazę histonową (HAT),

Rycina 3. Regulacja. Czynniki wzrostu, takie jak IGF1 lub cytokiny, prowadzą do aktywacji Akt oraz CDK2 (cyklinozależna kinaza 2) poprzez ścieżki Ras i PI3K. Powoduje to hiperfosforylację FoxO. Fosforylacja z udziałem Akt powoduje maskowanie regionu NLS, co pozwala na połączenie się FoxO z białkiem 14-3-3 i eksport kompleksu FoxO-14-3-3 z jądra do cytoplazmy z udziałem receptora CRM1 oraz białka Ran. Kompleks FoxO-14-3-3 w cytoplazmie pod wpływem ligazy ubikwitynowej SCF ulega ubikwitynizacji, czego konsekwencją jest degradacja FoxO. Kinaza MST1 ma wpływ na degradację FoxO w cytoplazmie poprzez proces rozzerwania kompleksu FoxO-14-3-3 i hiperfosforylację FoxO. Jest to negatywna regulacja aktywności FoxO. W przypadku, gdy zostanie ograniczone działanie czynników wzrostu lub cytokin, kompleks FoxO-14-3-3 zostaje importowany z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie podlega działaniu czynników aktywujących i relokalizacji w zależności od przeznaczenia. Enzym UPS7 hamuje ubikwitynizację FoxO, chroniąc białko przed degradacją. Jednak wiązanie FoxO z UPS7 powoduje inaktywację FoxO.



Rycina 4. Hamowanie. Aktywność FoxO i czynników wzrostu jest skorelowana na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego. FoxO wpływa na ekspresję genów kodujących czynniki wzrostu. Natomiast aktywność FoxO jest hamowana pod wpływem czynników wzrostu.

CYTOPLAZMA



katalizującą m.in. acetylację białka p300 stanowiącego ważny element procesu miogenezy [3, 4, 9]. Acetylacja FoxO może modyfikować aktywność tego czynnika na dwa przeciwstawne sposoby. Z jednej strony acetylacja wpływa na zahamowanie aktywacji FoxO, ograniczając jego funkcje transkrypcyjne, jednak są także doniesienia, które pokazują aktywację zacetylowanego FoxO [9]. Głównym powodem, dla którego wydzielono dwa przeciwstawne skutki acetylacji FoxO, jest to, że do tej pory nie odróżnia się skutków acetylacji FoxO od skutków acetylacji histonów [4, 9]. Sam mechanizm acetylacji FoxO jest bardzo złożony i nie został do końca poznany. Najprawdopodobniej interakcja FoxO wymaga obecności białka 14-3-3, które powoduje wytworzenie specyficznego kompleksu FoxO-deacetylazy histonowe (sirtuiny-Sirt 1) [9]. Dopiero powstanie takiego kompleksu skutkuje aktywacją FoxO. W strukturze FoxO można wyróżnić wiele miejsc acetylacji. Na skrzydle W2 zorganizowane są trzy takie miejsca. Sekwencje acetylowane znajdują się również na C-terminalnym końcu domeny transkrypcyjnej i obejmują sekwencję lizyn. Na podstawie tego, że C-terminalna część domeny transkrypcyjnej jest odpowiedzialna za rozpoznawanie i wiązanie DNA oraz stabilizację kompleksu FoxO-DNA, acetylacja tej części może doprowadzić do ograniczenia zdolności wiązania się FoxO z DNA [6, 9]. Na podstawie tego, iż C-terminalna część FoxO pokrywa się z sekwencją odpowiedzialną za lokalizację FoxO w jądrze komórkowym, funkcje tej domeny mogą być również modyfikowane przez acetylację [9].

Ubikwitynizacja FoxO

Ubikwitynizacja to modyfikacja polegająca na przyłączeniu ubikwityny do białka, które na-

stępnie ulega degradacji. Wyróżniamy dwa warianty ubikwitynizacji FoxO: pierwszy, tzw. poliubikwitynizacja, przy udziale kinazy S2 (SKP2, *S-phase kinase-associated protein 2*) oraz drugi – monoubikwitynizacja [8, 9]. Nadekspresja SKP2 powoduje znaczny spadek aktywności FoxO1 spowodowany proteosomalną degradacją tego białka [8]. Jednakże białko FoxO1 nie pozostaje bez wpływu na aktywność SKP2. Ufosforylowany FoxO1 jest niezbędny do działania SKP2 [8]. Udowodniono, że fosforylacja FoxO z udziałem kinaz AKT/PKB ma znaczenie również w procesach poliubikwitynizacji FoxO i jego proteosomalnej degradacji [8, 9]. Mechanizmy tych procesów nie są w pełni poznane [9].

Monoubikwitynizacja jest najprawdopodobniej indukowana przez stres oksydacyjny. Zachodzi w tym samym regionie C-terminalnym cząsteczki co acetylacja [9]. Skutkiem tej modyfikacji potranslacyjnej jest zmiana położenia FoxO w komórce oraz poprawa aktywności danego czynnika transkrypcyjnego [9]. Ubikwitynizacji FoxO przeciwdziała enzym USP7. Ma on zdolność wiązania się z białkiem FoxO, przez co hamuje jego aktywność i powoduje deubikwitynizację białka [9].

FoxO – funkcja

FoxO pełnią swoją funkcję poprzez modulowanie ekspresji genów odpowiedzialnych za przebieg wielu procesów życiowych, m.in.: koordynację cyklu komórkowego, kontrolę procesów metabolicznych, naprawę uszkodzeń DNA, reakcję na stres oksydacyjny, przemianę glukozy [1–3, 6–7]. FoxO odgrywają swoją rolę poprzez modulowanie ekspresji genów zaangażowanych w wyżej wymienione procesy [1, 2, 4, 6].

FoxO a metabolizm komórkowy

FoxO uczestniczą bezpośrednio lub pośrednio w wielu szlakach metabolicznych. Wątroba, trzustka, oś podwzgórze-przysadka oraz tkanka tłuszczowa to najważniejsze miejsca, gdzie regulowane są krążące metabolity oraz hormony. Wykazano, że FoxO powodują wzrost stężenia glukozy w wyżej wymienionych tkankach. W badaniach na modelu zwierzęcym wykazano istotny wpływ FoxO1 na przebieg glikolizy i glukoneogenezy w hepatocytach myszy [2]. Zablockowanie aktywacji FoxO1 w komórkach wątroby powoduje spadek stężenia glukozy u nowo narodzonych i dorosłych myszy [11]. U zwierząt z wyindukowaną cukrzycą stwierdzono hiperfosforylację FoxO3a [2]. Ponadto hamowanie aktywności tego czynnika może

być indukowane przez czynnik neurotroficzny komórek glejowych, który chroni komórki przed hiperglikemią [2]. Najnowsze badania wskazują na kluczową rolę czynników transkrypcyjnych FoxO1 oraz koaktywatora 1 α receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (PGC-1 α) w procesie regulacji ogólnoustrojowych przemian energetycznych [12]. W zależności od typu komórki, FoxO mogą wpływać w różny sposób na zachowanie rezerwy energetycznej. Nadekspresja FoxO1 w miocytach myszy może prowadzić do obniżenia glikemii oraz redukcji masy mięśniowej [2].

Badania na myszach nokautowanych FoxO1 +/- udowodniły, że nokaut chroni zwierzęta przed cukrzycą indukowaną dietą. U myszy, które zostały poddane diecie o obniżonej kaloryczności, zaobserwowano nadprodukcję FoxO1, FoxO3a i FoxO4 [2]. Chociaż zwierzęta te stają się otyłe, to ich komórki tłuszczowe nie wykazują hipertrofii i mają obniżone stężenie adipokina, czynnika martwicy guza alfa (TNF α) oraz rezystyny (czynników odpowiedzialnych za rozwój insulinooporności). Te obserwacje dają się po części wytłumaczyć zdolnością FoxO1 do ekspresji genu białka p21 (inhibitora cyklu komórkowego preadipocytów), a tym samym – uniemożliwiania klonalnego rozwoju i dalszego różnicowania się adipocytów [13].

Aktywność FoxO1 i PGC-1 α w wątrobie jest regulowana przez insulinę. Insulina inaktywuje FoxO1, przez co przyczynia się do represji genów kontrolowanych przez ten czynnik transkrypcyjny. Zjawisko to odnotowano nie tylko w hepatocytach, ale również w nefronach [14]. Do białek, których produkcja zależy od FoxO1, należą m.in. enzymy regulatorowe glukoneogenezy: glukozo-6-fosfataza (G-6-fosfataza) i karboksykinaza fosfoenolopirogronianowa (PEPCK) [15]. Spadek stężenia insuliny aktywuje (deacetyluje) FoxO1 bezpośrednio oraz pośrednio, przez aktywację NAD-zależnych deacetylaz – sirtuin (Sirt 1). Inaktywacja FoxO1 hamuje z kolei aktywację PGC-1 α . Transkrypcja GC-1 α jest również hamowana bezpośrednio przez insulinę [11, 12, 14]. Doświadczenia na myszach wykazały z kolei zahamowanie syntezy FoxO1 (spowodowane delecją genu kodującego to białko) i jednocześnie zapobieganie cukrzycy w hepatocytach pozbawionych receptorów insulinowych [11].

Kolejny efekt obecności FoxO1 w komórkach wątroby to ich wpływ na wzrost stężenia białka wiążącego insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGFBP1). U głodzonych myszy utrata FoxO1 skutkowałą spadkiem ekspresji IGFBP1 [12].

Najnowsze doniesienia wskazują na FoxO1 jako na czynnik transkrypcyjny dla apolipoproteiny C III (apo C III), która odgrywa rolę ważnego regulatora aktywności lipazy lipoproteinowej. Apo C III hamuje usuwanie triglicerydów, a więc

zwiększona ekspresja apo C III może przyczyniać się do hipertriglicerydemii w stanach insulinooporności [12].

W hodowli komórek β trzustki nawet niewielka ekspresja jądrowej formy FoxO1 skutkuje znacznym osłabieniem metabolizmu: zahamowaniem glikolizy, spadkiem wydzielania insuliny i wzrostem utleniania wolnych kwasów tłuszczowych [16]. Ekspresja FoxO1 w komórkach β myszy transgenicznych zapobiega kompensacyjnej proliferacji komórek β , co ma miejsce w przypadku insulinooporności [17]. W przeciwieństwie do doświadczeń przeprowadzonych in vitro ekspresja FoxO1 in vivo nie powoduje spadku stężenia krążącej insuliny [16, 17]. Fakt ten sugeruje, że FoxO mogą zwiększać stężenie krążącej glukozy na dwa sposoby: hamując wydzielanie insuliny lub powodując zmniejszenie podziałów komórek β trzustki. Zatem czynniki FoxO działają w „porozumieniu” – zwiększają stężenie glukozy, regulując glukoneogenezę i glikolizę w hepatocytach, oraz powodują spadek produkcji insuliny przez trzustkę [17].

Podwzgórze reguluje pobór pokarmu i homeostazę energetyczną poprzez zlokalizowane w nim ośrodki sytości i głodu. Czynniki FoxO kontrolują homeostazę metabolitów poprzez regulację produkcji neuropeptydu w neuronach podwzgórza. Badania prowadzone niezależnie w dwóch ośrodkach naukowych potwierdziły obecność FoxO1 w jądrze półksiężycowatym podwzgórza. FoxO1 indukuje ekspresję genów pobudzających apetyt: neuropeptydu Y (NPY) oraz *agouti-related protein* (AGRP) [15]. Jednocześnie FoxO1 ma funkcję supresorów dla neuropeptydów znoszących łaknienie, np. dla proopiomelanokortyny (POMC). Mechanizm polega na hamowaniu indukcji genu *pomc* przez czynnik transkrypcyjny Stat3. Insulina i leptyna (hormony sytości) zmniejszają ekspresję FoxO1 w neuronach podwzgórza [11].

FoxO a stres oksydacyjny, apoptoza i długowieczność

Apoptoza z udziałem FoxO może zachodzić na dwa różne sposoby, zależy to od rodzaju komórki [8, 13]. Jedną z możliwości to droga Fas-zależna, w której uczestniczy FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) – białko łączące, poprzez tzw. domenę śmierci, receptor Fas i inne receptory: DR4/5 oraz TRADD (*TNF receptor type 1-associated death domain protein*), z kaspazą 8. FoxO indukuje ekspresję genów dla ligandów receptorów Fas (FasL), DR4/5 (TRAIL, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) i TRADD. Zaktywowane receptory inicjują reakcje z udziałem kaspaz: 8 i 3, co w konsekwencji prowadzi do śmierci komórki [17]. Tak dzieje się w komórkach hematopoetycznych, np. komórkach T Jurkata,

czyli unieśmiertelnionych limfocytach typu T [7], a także w komórkach nerwowych [7], np. komórkach glejaka (308/93). Drugi szlak (Fas-niezależny) prowadzący do apoptozy zachodzi z udziałem białka Bim, dla którego FoxO jest czynnikiem transkrypcyjnym. Ekspresja Bim prowadzi do dezintegracji błony mitochondrialnej, w wyniku czego do cytoplazmy dostaje się cytochrom c i zapoczątkowuje reakcje z udziałem kaspaz i utworzeniem apoptosomu, co w ostateczności prowadzi do śmierci komórki [3].

FoxO oprócz podwyższania stężenia białek proapoptotycznych powodują zahamowanie syntezy białek, których celem jest niedopuszczenie do śmierci komórki. Poprzez indukcję represorowego białka Bcl-6 nie dochodzi do wzrostu stężenia zapobiegającego apoptozie białka Bcl-XL [8, 13]. Dowodem na to jest wynik doświadczenia na mysich makrofagach pozbawionych Bcl-XL, w którym zaobserwowano apoptozę później niż w komórkach kontrolnych [5].

Nadekspresja FoxO powoduje wzrost produkcji białka p27 kip1 (inhibitora cyklu komórkowego), a tym samym zatrzymanie proliferacji. Udowodniono, że FoxO1, FoxO3a i FoxO4 (poprzez ekspresję genu białka p27 kip1) blokują przejście komórek ludzkich w fazę G1 [5, 8, 18]. Badania wykazały także wzrost stężenia innych białek – produktów genów regulowanych przez FoxO, czego konsekwencją jest przejście komórki w stan spoczynku. Należy do nich m.in. białko Rb-podobne (*pRb-like protein*) oraz białko p130 [7]. FoxO3a uniemożliwia przejście z fazy G2 do M w wyniku indukcji cykliny G2 oraz białka Gadd45a – proteiny odpowiedzialnej za zatrzymanie wzrostu komórkowego oraz naprawę DNA [19]. Doświadczenia na fibroblastach wykazały znaczne upośledzenie mechanizmów reperacyjnych materiału genetycznego w komórkach pozbawionych genu Gadd45a [8, 20]. Indukcję transkrypcji Gadd45a, oprócz FoxO3a, zapoczątkowuje także FoxO4, a sam proces naprawy polega przede wszystkim na demetylacji DNA [21]. Najnowsze dane wskazują inny sposób reperacji materiału genetycznego. W komórkach raka prostaty (linia LNCAP) poddanych promieniowaniu jonizującemu zaobserwowano kowalencyjne wiązanie się FoxO3 z kinazą ATM (*Ataxia Teleangiectasia Mutated*), co spowodowało autofosforylację kinazy ATM, a tym samym rozpoczęcie szeregu reakcji prowadzących do naprawy DNA [22].

Sugeruje się, że obecność FoxO jest konieczna do prawidłowego przebiegu procesu cyklu komórkowego. Do takich wniosków skłonił naukowców fakt, że FoxO ma wpływ na ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję białek biorących udział w procesie mitozy: cykliny B oraz

kinazy polo-podobnej (PLK) [7, 19, 20]. Jednak z drugiej strony FoxO1 i FoxO3a działają hamująco na cyklinę D1 i cyklinę D2, co skutkuje zatrzymaniem interfazy w stadium G1 [8].

Uwalnianie reaktywnych form tlenu (ROS) podczas stresu oksydacyjnego może inicjować powstawanie różnych stanów chorobowych, takich jak udar mózgu, cukrzyca czy przewlekłe choroby degeneracyjne, m.in. choroby Alzheimera [2]. FoxO w większości komórek pełni funkcję ochronną w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Ochrona ta polega na ekspresji genów białek antyoksydacyjnych. FoxO3a powoduje ekspresję mitochondrialnej dysmutazy nadtlenu manganu (MnSOD) oraz katalazy, co umożliwia „pozbycie się” wolnych rodników tlenu [18, 23]. W wielu ośrodkach badawczych wyniki doświadczeń jednoznacznie potwierdziły tezę, że wzmożona ekspresja FoxO3 prowadzi pośrednio do zmniejszenia w komórce ilości reaktywnych form tlenu, a tym samym – do przedłużenia życia komórek [1, 18]. Ponadto wykazano, że w warunkach słabego stresu oksydacyjnego FoxO3a wpływa na regulację naprawy DNA, natomiast w stanie silnego stresu oksydacyjnego zapoczątkowuje śmierć komórki [3].

Podobna sytuacja występuje w warunkach stresu cytotoksycznego. Otóż wpływ chemioterapeutyków (Taxol, dokсорubicyna) może aktywować FoxO3a, co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego i apoptozy. Bardzo niepokojące jest jednak to, że ciągła aktywacja FoxO3a może powodować uodpornianie się komórek nowotworowych na chemioterapeutyki poprzez indukcję ekspresji genów takich jak MDR1 [18].

FoxO a komórki macierzyste, komórki krwi oraz komórki odpornościowe

W odniesieniu do rozwoju i różnicowania się komórek macierzystych białka FoxO są zaangażowane w procesy prowadzące do wytworzenia erytroidalnych, nerwowych i krwiotwórczych komórek macierzystych [2]. Równoczesne usunięcie FoxO1, FoxO3a i FoxO4 w modelu myszy spowodowało powstanie wad w populacji krwiotwórczych komórek macierzystych, co doprowadziło do apoptozy tych komórek [2]. Jednakże inne badania sugerują, że FoxO3a jako samodzielny czynnik może odegrać ważną rolę w utrzymaniu krwiotwórczych komórek macierzystych, czego dowodem jest słabe rozwinięcie komórek układu krwiotwórczego u myszy z niedoborem tego czynnika. Ponadto wzrost i różnicowanie się komórek macierzystych może zależeć od współdziałania czynników wzrostowych takich jak czynnik wzrostu cytokin i EPO (erytropoetyna) oraz FoxO3a, a ponadto może wymagać regulacji ekspresji poszczególnych genów FoxO3a-EPO [2].

Prowadzone badania udowadniają, iż białka FoxO odgrywają istotną rolę w regulowaniu rozwoju i proliferacji komórek macierzystych. Co jeszcze ważniejsze, te badania wskazują na konieczność dalszego badania powyższych zależności, aby poznać potencjał FoxO jako czynnika wywierającego pewien wpływ biologiczny [2].

Białka FoxO są kluczowymi elementami rozwoju systemu odpornościowego i układu krwiotwórczego. U myszy z niedoborem dla FoxO3a stwierdzano limfoproliferację, stany zapalne ślinianek, płuc i nerek oraz zwiększoną aktywność limfocytów T pomocniczych [2]. Wyniki badań na myszach potwierdzają udział FoxO3a w zapobieganiu nadpobudliwości limfocytów T. Na różnicowanie się i przeżycie komórek odpornościowych limfocytów T wpływają IL-2 i IL-3. Natomiast ich działanie jest hamowane obecnością aktywnego

czynnika FoxO3a. Żeby IL-2 i IL-3 mogły pełnić w organizmie swoje funkcje, FoxO3a ulega inaktywacji poprzez fosforylację za pomocą kinazy PI3K/PKB [3].

Ponadto stwierdzono, że FoxO3a ma znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania granulocytów, ponieważ myszy pozbawione tego czynnika są odporne na modele neurotroficznego zapalenia [2].

Adres do korespondencji:

mgr inż. Karina Ryterska
Zakład Biochemii i Żywienia Człowieka
Pomorski Uniwersytet Medyczny
71-460 Szczecin, ul. Broniewskiego 24
e-mail: ryterska.karina@gmail.com

Piśmiennictwo:

- Huang H., Tindall D.J.: Dynamic FoxO transcription factors. *J. Cell. Sci.* 2007 Aug 1, 120(Pt 15): 2479-87.
- Maiese K., Zhong Chong Z., Chen Shang Y.: Out Foxoing disease and diatability: therapeutic potential of targeting FoxO proteins. *Trends Mol. Med.* 2008, 14(5): 219-227.
- Birkenkamp K.U., Coffey P.J.: Regulators of Immune Homeostasis: FOXO Transcription Factors as Molecules to Die for? *J. Immunol.* 2003 Aug 15, 171(4): 1623-9.
- Brent M., Anand R., Marmorstein R.: Structural Basis for DNA Recognition by FoxO1 and its Regulation by Posttranslational Modification. *Structure* 2008 Sep 10, 16(9): 1407-1.
- Burgering B.M., Kops G.J.: Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem. Sci.* 2002 Jul, 27(7): 352-60.
- Calnan D. R., Brunet A.: The FOXO code. *Oncogene* 2008, 27: 2276-2288.
- Birkenkamp K.U., Coffey P.J.: Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. *Biochemical Society Transactions* 2003 Feb, 31(Pt 1): 292-7.
- Weidinger C., Krause K., Klagge A., Karger S., Fuhrer D.: Forkhead box-O transcription factor: critical conductors of cancer's fate. *Endocrine-Related Cancer* 2008, 15: 917-929.
- Obsil T., Obsilova V.: Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene* 2008, 27: 2263-2275.
- Hedrick S.M.: The cunning little vixen: Foxo and cycle of life and death. *Nat. Immunol.* 2009, 10: 1057-1063.
- Salih D.A., Brunet A.: FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008 Apr, 20(2): 126-36.
- Gross D.N., van den Heuvel A.P., Birnbaum M.J.: The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene* 2008 Apr 7, 27(16): 2320-36.
- Nakae J., Kitamura T., Kitamura Y., Biggs W.H. 3rd, Arden K.C., Accili D.: The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev. Cell.* 2003 Jan, 4(1): 119-29.
- Barthel A., Schmolli D., Unterman T.G.: FoxO proteins in insulin action and Metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2005 May/June, 16(4): 183-9.
- Cheng Z.: Targeting FOXO1 from the concept to metabolic diseases-lessons from mouse models. *Antioxid. Redox Signal.* 2010 Jul 8. [online].
- Buteau J., Shlien A., Foisy S., Accili D.: Metabolic diapause in pancreatic beta-cells expressing a gain-of-function mutant of the forkhead protein Foxo1. *J. Biol. Chem.* 2007 Jan 5, 282(1): 287-93.
- Okamoto H., Hribal M.L., Lin H.V., Bennett W.R., Ward A., Accili D.: Role of the forkhead protein FoxO1 in beta cell compensation to insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2006 Mar, 116(3): 775-82.
- Lam E.W., Francis R.E., Petkovic M.: FOXO transcription factors: key regulators of cell fate. *Biochem. Soc. Trans.* 2006 Nov, 34(Pt 5): 722-6.
- Alvarez X., Martinez B., Burgering A.C., Carrera A.C.: Forkhead transcription factors contribute to execution of the mitotic programme in mammals. *Nature (London)* 2001, 413: 744-747.
- van der Heide L.P., Hoekman M.F., Smidt M.P.: The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J.* 2004 Jun 1, 380(Pt 2): 297-309.
- Tran H., Brunet A., Grenier J.M., Datta S.R., Fornace A.J. Jr, DiStefano P.S., Chiang L.W., Greenberg M.E.: DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3A through the GADD45 protein. *Science* 2002, 296: 530-534.
- Tsai W.B., Chung Y.M., Takahashi Y., Xu Z., Hu M.C.: Functional interaction between FOXO3a and ATM regulates DNA damage response. *Nat. Cell. Biol.* 2008 Apr, 10(4): 460-7.
- Glauser D.A., Schlegel W.: The emerging role of FOXO transcription factors in pancreatic beta cells. *J. Endocrinol.* 2007 May, 193(2): 195-207.

MIEJSCE WIELONIENASYCONYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH OMEGA-3 W WYTYCZNYCH PREWENCJI CHOROÓB SERCOWO-NACZYNIOWYCH

OMEGA-3 FATTY ACIDS IN GUIDELINES ON CARDIOVASCULAR DISEASE PREVENTION

Streszczenie

Badania obserwacyjne i eksperymentalne przypisują szczególną rolę wielonienasyconym kwasom tłuszczowym (ang. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) omega-3 (ω -3), takim jak kwas eikozapentaenowy (EPA) i dokozaheksaenowy (DHA), w prewencji chorób sercowo-naczyniowych (ChSN). Działanie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 na układ krążenia wynika głównie ze wzbogacenia fosfolipidów błon komórkowych w EPA i DHA. W ten sposób wywołują one działanie antyarytmiczne, hipotensyjne, przeciwplateletowe i przeciwzapalne, poprawiają czynność śródbłonna oraz korzystnie wpływają na aktywność układu autonomicznego. Do działania kardioprotekcyjnego przyczynia się też wpływ na profil lipidowy. Najbardziej wyraźnym efektem działania PUFA ω -3 jest zmniejszenie stężenia triglicerydów. Ponadto obserwuje się nieznaczne zwiększenie stężenia HDL oraz LDL. Korzystny efekt spożywania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 znalazł odzwierciedlenie w rekomendacjach europejskich oraz amerykańskich towarzystw naukowych, co podsumowano w niniejszym artykule.

Słowa kluczowe: wielonienasycone kwasy tłuszczowe, prewencja, choroba sercowo-naczyniowa

Abstract

Observational and experimental studies attribute the special role of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), omega-3, such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), to the prevention of cardiovascular disease (CVD). The action of polyunsaturated fatty acids omega-3 on the cardiovascular system is mainly due to the enrichment of phospholipids of cell membranes in EPA and DHA. In this way they exert antiarrhythmic, antihypertensive, antiplatelet and anti-inflammatory action, improve endothelial function and positively influence the autonomic nervous system activity. The modification of a lipid profile also contributes to this cardioprotective effect. The clearest effect of PUFA omega-3 is to reduce the concentration of TG. In addition, a slight increase in HDL-C and LDL-C is observed. The benefit of consuming omega-3 was reflected in the recommendations of the European and American scientific societies which are summarized in this article.

Key words: polyunsaturated fatty acids, prevention, cardiovascular disease

Wprowadzenie

Badania obserwacyjne i eksperymentalne przypisują szczególną rolę wielonienasyconym kwasom tłuszczowym (ang. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) omega-3 (ω -3), takim jak kwas eikozapentaenowy (EPA) i dokozaheksaenowy (DHA), w prewencji chorób sercowo-naczyniowych

(ChSN). Pierwsze obserwacje z lat 70. ubiegłego wieku dotyczyły Eskimosów zamieszkujących Grenlandię, którzy mimo diety ubogiej w owoce, warzywa i złożone węglowodany, a bogatej w tłuszcze i cholesterol mieli stosunkowo niskie stężenie triglicerydów (TG), chylomikronów, cholesterolu LDL (LDL-C) i wysokie stężenie chole-

sterolu HDL (HDL-C) w surowicy oraz rzadziej chorowali na zawał serca niż kontrolna populacja Duńczyków [1]. W latach 80. udowodniono, że ten korzystny efekt był przynajmniej częściowo efektem spożywania ryb bogatych w EPA i DHA [2].

Mechanizm działania

Zmiany w składzie błon komórkowych

Korzystne działanie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych omega-3 (PUFA ω -3) na układ krążenia wynika przede wszystkim ze wzbogacenia fosfolipidów błon komórkowych w EPA i DHA. W ten sposób wywierają one wpływ antyarytmiczny, hipotensyjny, przeciwplatek i przeciwzapalny, poprawiają czynność śródbłonna oraz korzystnie wpływają na aktywność układu autonomicznego [3]. W mniejszym stopniu do działania kardioprotekcyjnego przyczynia się też korzystny wpływ na profil lipidowy [3].

Korzyści z zastosowania PUFA ω -3 zależą w dużej mierze od dawki. Przy mniejszych dawkach (0,5–1,0 g/dobę), dostępnych w odpowiedniej diecie, dominuje efekt antyarytmiczny, który przejawia się zmniejszeniem ryzyka nagłego zgonu lub zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych już po kilku tygodniach stosowania. W wyższych dawkach (3–4 g/dobę) i przy dłuższym stosowaniu preparatu dochodzą dodatkowe efekty (hipotensyjny, przeciwplatek, przeciwzapalny, zmniejszenie stężenia triglicerydów) poprawiające rokowanie w zakresie innych punktów końcowych, np. zawału serca niezakończonego zgonem [4].

Zmiany w lipidogramie

Najbardziej wyraźnym efektem działania PUFA ω -3 jest zmniejszenie stężenia TG. Ponadto obserwuje się nieznaczne zwiększenie stężenia HDL-C oraz LDL-C. Dla przykładu, w metaanalizie 21 badań, w których u ok. 8 tys. pacjentów stosowano PUFA ω -3 w dawce 0,8–5,4 g, stwierdzono: zmniejszenie stężenia TG o 27 mg/dl (95% CI: 20–33 mg/dl), zwiększenie stężenia HDL-C o 1,6 mg/dl (95% CI: 0,8–2,3 mg/dl) i LDL-C o 6 mg/dl (95% CI: 3–8 mg/dl) [5]. Metaanaliza 72 badań [6] z zastosowaniem placebo wykazała, że przyjmowanie 3–4 g EPA i DHA prowadzi do zmniejszenia stężenia TG o 25–35%. We wspomnianej wyżej metaanalizie [5] wielkość redukcji zależała od wyjściowego stężenia TG oraz dawki leku. Zwiększeniu dawki PUFA ω -3 o 1 g/dobę towarzyszyło zmniejszenie TG o 8 mg/dl. Na każde dodatkowe 100 mg/dl TG w surowicy obserwowano dodatkowe zmniejszenie stężenia TG pod wpływem leczenia o 16 mg/dl [1]. Kwasy tłuszczowe ω -3 mogą zwiększać stężenie LDL-C, zwłaszcza u pacjentów z hipertriglicydemią. Zbiorcza analiza dwóch badań, w których stosowano estry

etylowe ω -3 w dawce 4 g PUFA (Omacor) u pacjentów z TG >500 mg/dl, wykazała zmniejszenie stężenia TG o 45% i zwiększenie LDL-C o 45% (wyjściowo średnio 89 mg/dl) [1]. Uważa się jednak, że wzrost stężenia LDL-C jest wynikiem nie tyle zwiększenia liczby cząsteczek LDL, ile ich wielkości, za czym przemawia zmniejszenie stężenia apolipoproteiny B (apoB) oraz cholesterolu nie-HDL. Pod wpływem PUFA ω -3 zmniejsza się stężenie małych gęstych (bardziej aterogennych) cząsteczek LDL, tzw. fenotyp B, na rzecz zwiększenia stężenia dużych, mniej aterogennych cząsteczek, tzw. fenotyp A. Głównym motorem takiej przemiany jest zmniejszone stężenie TG, dlatego podobne zmiany stężenia LDL-C obserwowano także u pacjentów z ciężką hipertriglicydemią leczonych fibratami (gemfibrozil, fenofibrat) [1]. U pacjentów, u których do statyny dodawano kwasy ω -3 ze względu na zwiększone stężenie TG (200–499 mg/dl), zwykle nie dochodziło do wzrostu stężenia LDL-C, obserwowano za to redukcję stężenia cholesterolu nie-HDL i apoB [1].

PUFA ω -3 a klinicznie istotne punkty końcowe

Wpływ suplementacji PUFA ω -3 na klinicznie istotne punkty końcowe był przedmiotem dużych prób klinicznych, które krótko scharakteryzowano poniżej.

DART (*Diet And Reinfarction Trial*) – grupa losowo wybranych pacjentów po zawale serca otrzymywała poradę dotyczącą zwiększenia spożycia tłustych ryb lub kapsułek zawierających olej rybny. W 2-letniej obserwacji skutkowało to zmniejszeniem umieralności ogólnej o 29% w porównaniu z grupą nieotrzymującą takiego zalecenia [7].

GISSI-Prevenzione (*The Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico – Prevenzione*) – u losowo wybranych 11 323 pacjentów po zawale serca dodanie do standardowej terapii kapsułki (1 g/dobę) zawierającej wysoko oczyszczone estry etylowe PUFA ω -3 (1 kapsułka zawierała 850 mg DHA i EPA) w 3,5-rocznej obserwacji skutkowało zmniejszeniem umieralności ogólnej o 21% (efekt widoczny już po 3 miesiącach stosowania leku), ryzyka nagłej śmierci sercowej o 45% (efekt widoczny po 4 miesiącach), umieralności z przyczyn sercowych o 35% (efekt po 6 miesiącach), sercowo-naczyniowych o 30% i wieńcowych o 32% (efekt po 9 miesiącach) [8].

JELIS (*Japan EPA Lipid Intervention Study*) – 18 645 pacjentów z hipercholesterolemią przydzielono losowo do leczenia statyną lub statyną w skojarzeniu z EPA (1,8 g/dobę). Suplementacja EPA skutkowała zmniejszeniem ryzyka po-

ważnego zdarzenia sercowo-naczyniowego o 19% w czasie 5-letniej obserwacji [9].

GISSI-HF (GISSI-Heart Failure) – 6975 pacjentów z niewydolnością serca w klasie II–IV wg NYHA, bez względu na jej przyczynę i wielkość frakcji wyrzutowej lewej komory przydzielono losowo do grupy stosującej wysoko oczyszczone PUFA ω -3 w dawce 1 g/dobę lub do grupy placebo. Po średnio 3,9 roku odnotowano zmniejszenie ryzyka zgonu o 9%, a złożonego głównego punktu końcowego w postaci zgonu lub hospitalizacji z przyczyn kardiologicznych o 8% [10].

Wczesne zmniejszenie ryzyka nagłej śmierci sercowej w badaniu GISSI-Prevenzione przypisywano antyarytmicznemu działaniu PUFA ω -3. Hipotezę tę poddano weryfikacji w kilku kolejnych badaniach.

W badaniu FAAT (*Fatty Acid Antiarrhythmia Trial*) 10 402 pacjentów z wszczepionym kardiowerterem-defibrylatorem (ICD) w ciągu poprzedzającego roku lub z co najmniej jednym wyładowaniem ICD z powodu częstoskurczu komorowego (VT) lub migotania komór (VF) w tym czasie zostało przydzielonych losowo do grupy otrzymującej kapsułki zawierające estry etylowe EPA i DHA (2,6 g/dobę) lub oliwę z oliwek. Po roku obserwacji w grupie PUFA ω -3 stwierdzono trend (wynik na granicy istotności statystycznej) do wydłużenia czasu do pierwszego wyładowania ICD z powodu VT/VF lub zgonu z dowolnej przyczyny [11].

W badaniu SOFA (*Study on ω -3 Fatty Acid and Ventricular Arrhythmia*) 11 546 pacjentów z ICD i co najmniej jednym epizodem VT lub VF w poprzedzającym roku przydzielono losowo do grupy przyjmującej PUFA ω -3 w dawce 961 mg/dobę lub grupy przyjmującej placebo w postaci oleju słonecznikowego. Po roku obserwacji nie stwierdzono istotnej różnicy w częstości występowania głównego punktu końcowego (VT lub VF, lub zgon z dowolnej przyczyny): 70% w grupie leczonej v. 67% w grupie placebo. Różnica była większa, choć też nieistotna statystycznie ($p=0,09$) w podgrupie pacjentów po zawale serca, odpowiednio 71% v. 63% [12].

Przeciwny trend zaobserwowano w pracy Raitta i wsp. [13], w której 200 pacjentów z ICD zostało losowo przydzielonych do grupy 1,3 g/dobę EPA i DHA lub grupy placebo (oliwa z oliwek). Po 2 latach obserwacji nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy między obiema grupami w częstości wyładowań ICD na skutek VT lub VF. Podanaliza pacjentów zakwalifikowanych do ICD z powodu VT wskazywała jednak na proarytmiczne działanie stosowanego preparatu (istotnie częstsze wyładowania ICD z powodu VT/VF). Z badania tego, w przeciwieństwie do opisanych

wyżej, wykluczono pacjentów z przebyłym niedawno epizodem VT/VF w przebiegu zawału serca. Przypuszcza się zatem, że większość epizodów groźnych arytmii była zależna od obecności blizny (a nie niedokrwienia) i dlatego nie poddawała się leczeniu arytmicznemu. Przedstawione wyniki prób klinicznych, jak również badania eksperymentalne przemawiają za antyarytmicznym działaniem PUFA ω -3 w warunkach niedokrwienia.

Korzyści ze stosowania PUFA ω -3 w prewencji migotania przedsionków (AF) wykazano u pacjentów po zabiegu pomostowania aortalno-wieńcowego. Suplementacja 850–882 mg PUFA ω -3 przez 5 dni przed zabiegiem oraz w okresie pozabiegowym, aż do czasu wypisania ze szpitala, skutkowała zmniejszeniem częstości epizodów AF i skróceniem czasu hospitalizacji [14].

Zalecenia towarzystw medycznych

Prewencja pierwotna chorób sercowo-naczyniowych

American Heart Association (AHA) [15] oraz **Polskie Forum Profilaktyki Chorób Układu Krążenia (PFP)** [16] zalecają spożywanie ryb, szczególnie tłustych, co najmniej 2 razy w tygodniu.

Amerykańska Agencja Żywności i Żywienia (Food and Drug Administration, FDA) zaleca ograniczenie spożycia ryb i owoców morza do 2 razy w tygodniu w populacjach najbardziej wrażliwych na zawarte w nich zanieczyszczenia. Wskazuje jednocześnie, że u kobiet po menopauzie oraz mężczyzn w średnim i starszym wieku ewentualne ryzyko związane ze spożyciem ryb jest znacznie mniejsze niż płynące z niego korzyści.

Komentarz

W badaniach kohortowych spożycie ryb było odwrotnie skorelowane z występowaniem choroby wieńcowej. Spożycie jednego posiłku zawierającego rybę wiązało się z redukcją ryzyka o 15%, a 5 posiłków – o 40% [17]. W opisanym wyżej badaniu JELIS dodanie EPA do statyny u pacjentów z hipercholesterolemią spowodowało zmniejszenie ryzyka incydentów sercowo-naczyniowych o 18% ($p=0,13$) w grupie osób bez choroby niedokrwiennej serca. Trwające obecnie badanie ASCEND (*A Study of Cardiovascular Events in Diabetes*) oceni przydatność stosowania PUFA ω -3 w dawce 1 g/dobę w prewencji pierwotnej ChSN u pacjentów z cukrzycą typu 1 i cukrzycą typu 2.

W przypadku dzieci i kobiet w ciąży należy zwrócić uwagę na rodzaj i miejsce połowu ryb ze względu na dużą zawartość metylorteci i polichlorowanych bifenyli, a także innych związków organicznych w mięsie niektórych gatunków (np. miecznika, rekina, makreli królewskiej, płytecznika). Usunięcie skóry oraz powierzchniowej war-

stwy tłuszczu z przygotowywanej do spożycia ryby zmniejsza ryzyko narażenia na zanieczyszczenia.

Hipertriglicerydemia

Zgodnie z wytycznymi PFP [18] PUFA ω -3 są zalecane:

- gdy TG \geq 500 mg/dl – w terapii skojarzonej z fibratem lub kwasem nikotynowym,
- w hiperlipidemii mieszanej – jako lek trzeciego rzutu, po zastosowaniu statyny i fibratu lub kwasu nikotynowego,
- w zespole chylomikronemii – w połączeniu z fibratami.

FDA w 2004 r. zaaprobowała stosowanie skoncentrowanej postaci EPA i DHA (Omacor w dawce 4 g) u dorosłych jako dodatku do diety w celu redukcji stężenia TG przy stężeniu TG $>$ 500 mg/dl (FDA.gov) [19].

Wiele badań sugeruje, że aby osiągnąć klinicznie istotne zmniejszenie stężenia TG, konieczne jest zastosowanie EPA i DHA w dawce 3–4 g/dobę, co jest równe 12–15 tabletkom stanowiącym suplement diety (tabletki zawierają 300–400 mg EPA i/lub DHA) lub 4 kapsułkom zawierającym skondensowane EPA i DHA w łącznej dawce 900 mg. Dostarczenie tak dużej dawki kwasów ω -3 za pomocą zwiększenia spożycia ryb jest mało prawdopodobne. Dla przykładu, do pokrycia dawki zalecanej w leczeniu hipertriglicerydemii konieczne jest spożycie 1,7 kg łososa (ryba o stosunkowo dużej zawartości ω -3) (www.aha.org).

Cukrzyca

W zaleceniach Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego 2010 rekomenduje się, aby 6–10% wartości energetycznej diety stanowiły tłuszcze wielonienasycone, w tym kwasy tłuszczowe omega-6 5–8%, a kwasy tłuszczowe omega-3 1–2%.

Komentarz

Analiza podgrup w opisanych wyżej badaniach, takich jak GISSI-HF [10] czy JELIS [20], wykazała korzystny wpływ PUFA ω -3 na występowanie incydentów sercowo-naczyniowych również u pacjentów z zaburzeniami gospodarki węglowodanowej. W toku jest wymienione wcześniej badanie ASCEND oraz badanie *Outcome Reduction with an Initial Glargine Intervention* (ORIGIN) zaprojektowane do oceny znaczenia Omacoru w dawce 1 g/dobę u pacjentów z nieprawidłową tolerancją glukozy, nieprawidłową glikemią na czczo lub cukrzycą typu 2 i wysokim ryzykiem sercowo-naczyniowym lub rozpoznaną ChSN.

Wpływ PUFA ω -3 na profil glikemii był przedmiotem badań obserwacyjnych i eksperymentalnych, dały one sprzeczne wyniki. W opublikowanej ostatnio analizie trzech dużych (łącznie

195 204 zdrowych mężczyzn i kobiet) badań kohortowych o okresie obserwacji 14–18 lat (*Nurses' Health Study*, *Nurses' Health Study 2*, *Health Professional Follow-Up Study*) spożywanie PUFA ω -3 wiązało się ze zwiększeniem ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 [21]. Nie jest jasne, na ile same PUFA ω -3, a na ile inne zawarte w rybach (będących źródłem kwasów ω -3 w tych badaniach) substancje wpłynęły na wynik tej analizy. Ostatnie badania wskazują na rolę dioksyn i metylortęci w zaburzeniu regulacji wydzielania insuliny [21]. Niekorzystnego wpływu PUFA ω -3 na profil glikemii nie potwierdza opublikowana niedawno metaanaliza 23 badań z randomizacją, przeprowadzonych łącznie na 1075 pacjentach z cukrzycą typu 2 leczonych średnio przez 8,9 tygodnia znacznie większymi dawkami PUFA ω -3 (średnio 3,5 g/dobę) niż w ww. analizie badań kohortowych (średnia w grupie maksymalnego spożycia wynosiła 0,6 g/dobę) [22]. Toczące się badania z randomizacją z zastosowaniem czystego preparatu EPA i DHA mają dostarczyć dodatkowych danych na ten temat.

Warte uwagi są doniesienia na temat znaczenia PUFA ω -3 w prewencji cukrzycy typu 1. W badaniu kohortowym *Diabetes Autoimmunity Study in the Young* (DAISY) u dzieci zagrożonych cukrzycą typu 1 (genotyp HLA, cukrzyca typu 1 u rodzeństwa lub rodziców) w 6-letniej obserwacji przeciwciała charakterystyczne dla tej choroby rzadziej występowały w grupie stosującej dietę bogatszą w PUFA ω -3 [23]. Ponadto ryzyko powstania autoprzeciwciał było odwrotnie skorelowane z zawartością PUFA ω -3 w błonie komórkowej erytrocytów.

Chorzy stosujący leki przeciwzakrzepowe

U pacjentów z chorobami na tle miażdżycy czy niewydolnością serca PUFA ω -3 muszą być stosowane łącznie z lekami przeciwzakrzepowymi, co budzi pewne kontrowersje w związku z przeciwpłytkowym działaniem tych kwasów. Badania eksperymentalne testujące zarówno połączenie PUFA ω -3 z doustnymi antykoagulantami (warfaryna) [24], heparyną (pacjenci poddawani pomostowaniu aortalno-wieńcowemu – CABG) [25], jak i z kwasem acetylosalicylowym (ASA) [26] nie potwierdzają jednak tych obaw. Niedawno opublikowane badanie retrospektywne [27] wskazuje na bezpieczeństwo stosowania PUFA ω -3 w dawce średnio 3 mg także w połączeniu z podwójnym leczeniem przeciwpłytkowym, tj. z ASA i kłopidogrelem.

Bezpieczeństwo stosowania PUFA ω -3 wykazano też u pacjentów poddawanych zabiegom związanym z ryzykiem krwawień, jak CABG, endarterektomia, angiografia i angioplastyka tętnic wieńcowych [28].

Choroba sercowo-naczyniowa na tle miażdżycy

Zalecenie ESC

(European Society of Cardiology)

Zawał serca z uniesieniem odcinka ST (STEMI) – prewencja wtórna

Można rozważyć zwiększenie spożycia kwasów omega-3 (tłuste ryby) u wszystkich chorych po przebytym zawałcie STEMI (klasa zaleceń IIb, poziom wiarygodności B). Suplementację omega-3 należy rozważyć u chorych nietolerujących statyn, zwłaszcza gdy stężenie TG jest >150 mg/dl (1,7 mmol/l) i/lub frakcji HDL cholesterolu <40 mg/dl (1,0 mmol/l) (klasa zaleceń IIa, poziom wiarygodności B) [29].

Zalecenia AHA/ACC (American Heart Association i American College of Cardiology)

Miażdżyca tętnic wieńcowych lub innych tętnic – prewencja wtórna

Można rozważyć zwiększenie spożycia kwasów tłuszczowych omega-3 w postaci ryb lub w kapsułkach (1 g/d) w celu zmniejszenia ryzyka sercowo-naczyniowego. Żeby osiągnąć ten cel w hipertriglicydemii, zwykle konieczne jest stosowanie większych dawek (IIb B) [30].

Zalecenia ESC/EACTS (European Society of Cardiology, European Association for Cardio-Thoracic Surgery)

Prewencja wtórna u chorych po rewaskularyzacji mięśnia sercowego

W długoterminowej interwencji w zakresie stylu życia i czynników ryzyka u chorych po rewaskularyzacji mięśnia sercowego można rozważyć zwiększenie spożycia kwasów tłuszczowych ω -3 w postaci oleju rybnego (IIb B).

W długoterminowym leczeniu farmakologicznym u wszystkich chorych wskazane jest stosowanie leków hipolipemizujących w dużej dawce, niezależnie od wyjściowego stężenia lipidów w osoczu, pod warunkiem, że nie ma przeciwwskazań (I A). Należy rozważyć stosowanie fibratów i kwasów tłuszczowych ω -3 (1 g/d) w połączeniu ze statynami i u chorych nietolerujących statyn (IIa B) [31].

Adres do korespondencji:

dr n. med. Grzegorz Kopec
Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II,
Klinika Chorób Serca i Naczyń Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego
31-201 Kraków, ul. Prądnicka 80
e-mail: gkopec@szpitaljp2.krakow.pl

Piśmiennictwo:

1. Jacobson T.A.: Role of n-3 fatty acids in the treatment of hyper-triglyceridemia and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008, 87: 1981S-90.
2. Bronsgeest-Schoute H.C., van Gent C.M., Luten J.B., Ruiten A.: The effect of various intakes of omega 3 fatty acids on the blood lipid composition in healthy human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 1981, 34: 1752.
3. Lee J.H., O'Keefe J.H., Lavie C.J. et al.: Omega-3 fatty acids for cardioprotection. *Mayo Clin. Proc.* 2008, 83: 324-32.
4. Mozaffarian D., Rimm E.B.: Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA* 2006, 296: 1885-99.
5. Balk E.M., Lichtenstein A.H., Chung M. et al.: Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. *Atherosclerosis* 2006, 189: 19-30.
6. Harris W.S.: n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 1997, 65: 1645S-54.
7. Ness A.R., Hughes J., Elwood P.C. et al.: The long-term effect of dietary advice in men with coronary disease: follow-up of the Diet and Reinfarction trial (DART). *Eur. J. Clin. Nutr.* 2002, 56: 512-8.
8. Marchioli R., Barzi F., Bomba E. et al.: Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation* 2002, 105: 1897-903.
9. Yokoyama M., Origasa H.: Effects of eicosapentaenoic acid on cardiovascular events in Japanese patients with hyper-cholesterolemia: rationale, design, and baseline characteristics of the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *Am. Heart J.* 2003, 146: 613-20.
10. Tavazzi L., Maggioni A.P., Marchioli R. et al.: Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2008, 9645: 1223-30.
11. Leaf A., Albert C.M., Josephson M. et al.: Prevention of fatal arrhythmias in high-risk subjects by fish oil n-3 fatty acid intake. *Circulation* 2005, 112: 2762-8.
12. Brouwer I.A., Zock P.L., Camm A.J. et al.: Effect of fish oil on ventricular tachyarrhythmia and death in patients with implantable cardioverter defibrillators: the Study on Omega-3 Fatty Acids and Ventricular Arrhythmia (SOFA) randomized trial. *JAMA* 2006, 295: 2613-9.
13. Raitt M.H., Connor W.E., Morris C. et al.: Fish oil supplementation and risk of ventricular tachycardia and ventricular fibrillation in patients with implantable defibrillators: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005, 293: 2884-91.
14. Calo L., Bianconi L., Colivicchi F. et al.: N-3 Fatty acids for the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a randomized, controlled trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005, 45: 1723-8.
15. Lichtenstein A.H., Appel L.J., Brands M. et al.: Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 2006, 114: 82-96.
16. Klosiewicz-Latoszek L., Szostak W.B., Podolec P. et al.: Polish Forum for Prevention Guidelines on Diet. *Kardiol. Pol.* 2008, 66: 812-4.
17. He K., Song Y., Daviglius M.L. et al.: Accumulated

evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Circulation* 2004, 109: 2705-11. **18.** Cybulska B., Szostak W.B., Podolec P. et al.: Polish Forum for Prevention Guidelines on Dyslipidaemia. *Kardiol. Pol.* 2008; 66: 1239-42. **19.** Lavie C.J., Milani R.V., Mehra M.R. et al.: Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009, 54: 585-94.

20. Oikawa S., Yokoyama M., Origasa H. et al.: Suppressive effect of EPA on the incidence of coronary events in hypercholesterolemia with impaired glucose metabolism: Sub-analysis of the Japan EPA Lipid Intervention Study (JELIS). *Atherosclerosis* 2009, 206: 535-9. **21.** Kaushik M., Mozaffarian D., Spiegelman D. et al.: Long-chain omega-3 fatty acids, fish intake, and the risk of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 2009, 90: 613-20. **22.** Hartweg J., Perera R., Montori V. et al.: Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2008, 23: CD003205. **23.** Norris J.M., Yin X., Lamb M.M. et al.: Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes. *JAMA* 2007, 298: 1420-8. **24.** Bender N.K., Kraynak M.A., Chiquette E. et al.: Effects of Marine Fish Oils on the Anticoagulation Status of Patients Receiving Chronic Warfarin Therapy. *J. Thromb. Thrombolysis* 1998, 5: 257-61.

25. DeCaterina R., Giannesi D., Mazzone A. et al.: Vascular prostacyclin is increased in patients ingesting omega-3 polyunsaturated fatty acids before coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* 1990, 82: 428-38. **26.** Eritsland J., Arnesen H., Gronseth K. et al.: Effect of dietary supplementation with n-3 fatty acids on coronary artery bypass graft patency. *Am. J. Cardiol.* 1996, 77: 31-6. **27.** Watson P.D., Joy P.S., Nkonde C. et al.: Comparison of bleeding complications with omega-3 fatty acids + aspirin + clopidogrel *versus* aspirin + clopidogrel in patients with cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* 2009, 104: 1052-4. **28.** Harris W.S.: Expert opinion: omega-3 fatty acids and bleeding-cause for concern? *Am. J. Cardiol.* 2007, 99: 44C-6. **29.** Van de Werf F., Bax J., Betriu A. et al.: Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation. *European Heart Journal* 2008, 29: 2909-2945.

30. Smith S.C., Allen J., Blair S.N. et al.: AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2006, 47: 2130-2139. **31.** Gajewski P., Leśniak W., Goncerz G.: Rewaskularyzacja mięśnia sercowego. Podsumowanie wytycznych European Society of Cardiology i European Association for Cardiothoracic Surgery 2010. *Medycyna Praktyczna* 2010, 11.

SKOJARZONE LECZENIE FENOFIBRATEM I STATYNĄ JEST SKUTECZNE I BEZPIECZNE U CHORYCH Z ATEROGENNĄ DYSLIPIDEMIĄ I CUKRZYCĄ TYPU 2. KOMENTARZ DO BADANIA ACCORD

COMBINED TREATMENT WITH FENOFIBRATE AND STATIN IS EFFECTIVE AND SAFE IN PATIENTS WITH ATHEROGENIC DYSLIPIDEMIA AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS. COMMENT ON THE RESULTS OF ACCORD TRIAL

*... with fat diabetes begins. From fat diabetics die, formerly of coma and recently of... arteriosclerosis.
(... cukrzyca rozpoczyna się od nadmiaru tłuszczu.
Nadmiar tłuszczu jest przyczyną zgonów chorych na cukrzycę,
wcześniej umierali oni z powodu śpiączki, a obecnie umierają z powodu... miażdżycy.)*

Elliot Joslin, Ann. Clin. Med. 1927

Streszczenie

Cukrzyca stanowi silny czynnik ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Ryzyko sercowo-naczyniowe w znacznej części warunkowane jest obecnymi w cukrzycy zaburzeniami lipidowymi określanymi jako *aterogenna dyslipidemia*. W komentarzu omówiono wyniki części lipidowej badania ACCORD, odnoszące się do testowanego w badaniu leczenia skojarzonego z zastosowaniem fenofibratu i simwastatyny. Wyniki badania ACCORD zestawiono z wynikami pozostałych badań „fibratowych” oraz z aktualnie obowiązującymi zaleceniami odnoszącymi się do klinicznego zastosowania fibratów, zwłaszcza u chorych z cukrzycą i ateroogenną dyslipidemią.

Słowa kluczowe: fibraty, cukrzyca typu 2, choroba sercowo-naczyniowa, aterogenna dyslipidemia

Abstract

Diabetes mellitus is considered as a strong cardiovascular risk factor. Cardio-vascular risk is largely driven by atherogenic dyslipidemia present in diabetic patients. In the paper the results of ACCORD lipid trial of combined treatment with fenofibrate and simvastatin are discussed along with other fibrate trials and current guidelines of fibrate treatment in diabetic patients with atherogenic dyslipidemia.

Key words: fibrates, type 2 diabetes, cardiovascular disease, atherogenic dyslipidemia

Już wiele dziesięcioleci temu prof. Joslin, jeden z najwybitniejszych badaczy cukrzycy, zwrócił uwagę na to, że opanowanie hiperglikemii zapobiega śmierci chorych na cukrzycę z powodu jej ostrych powikłań, jednak nadal umierają oni często, a przyczyną tej zwiększonej umieralności nie jest bezpośrednio hiperglikemia, lecz przyspieszony postęp miażdżycy.

Cukrzyca należy do najsilniej obciążających czynników ryzyka chorób sercowo-naczynio-

wych i jest powszechnie traktowana jak ekwiwalent ryzyka równoznaczny z obecnością objawowej choroby układu krążenia [1]. Badanie UKPDS udowodniło, że dla obniżenia ryzyka s-n co najmniej równie (a może nawet bardziej) istotne jest w cukrzycy typu 2, obok leczenia hipoglikemizującego, utrzymanie prawidłowych wartości ciśnienia oraz leczenie hiperlipidemii [2]. Cukrzycę charakteryzuje swoisty rodzaj zaburzeń lipidowych określany jako *aterogenna dyslipidemia*, która stanowi dzisiaj

narastający problem w prewencji chorób sercowo-naczyniowych. Wynika to z obserwacji epidemiologicznych, które pokazują, że izolowana hipercholesterolemia, choć nadal często spotykana, ustępuje miejsca złożonym formom zaburzeń lipidowych, gdzie oprócz aterogenicnej frakcji LDL istotne zmiany dotyczą innych frakcji lipoprotein. Wyjątkowo niepokojący jest postępujący wzrost średniego stężenia triglicerydów u mieszkańców Stanów Zjednoczonych, od lat 70. ubiegłego wieku w ślad za epidemicznym wzrostem występowania otyłości, insulinooporności i cukrzycy typu 2 [3]. Jednocześnie odnotowano spadek średniego stężenia cholesterolu LDL w tym okresie [4]. Typową konfiguracją aterogenicnej dyslipidemii jest wzrost stężenia triglicerydów wynikający z gromadzenia się w surowicy lipoprotein VLDL oraz upośledzonego klirensu chylomikronów gromadzących tłuszcz pochodzenia pokarmowego. Przyczynami tego są występujące w stanach insulinooporności odhamowanie syntezy VLDL w wątrobie oraz upośledzona funkcja osoczowej lipazy lipoproteinowej [5]. Hipertriglicydemii towarzyszy obniżenie stężenia cholesterolu HDL związane ze zmniejszeniem liczby odpowiadających lipoprotein. Jednocześnie pogorszeniu ulega „jakość” cząstek HDL – ich funkcja ochronna zostaje zaburzona. Umiarkowanie podwyższone stężenia cholesterolu LDL nie odzwierciedlają we właściwy sposób promiażdżycowego potencjału lipoprotein LDL, które, podobnie jak lipoproteiny HDL, zmieniają swoją strukturę w niekorzystny sposób, przekształcając się w tzw. małe, gęste LDL. Cząstki te łatwo przenikają do ściany naczyniowej i jednocześnie ulegają łatwej modyfikacji (utlenianiu, glikacji i in.). Aterogenicna dyslipidemia jest zaburzeniem występującym u osób ze stanami insulinooporności, najczęściej związanymi z otyłością, zespołem metabolicznym i cukrzycą, i w jednoznaczny sposób sprzyja szybkiemu postępowi miażdżycy w tych stanach klinicznych. Aterogenicna dyslipidemia jest także charakterystycznym zaburzeniem występującym u chorych z przewlekłą chorobą nerek [6].

Leczenie zaburzeń lipidowych stanowi jeden z filarów zapobiegania chorobom układu krążenia. Od kilkudziesięciu lat dysponujemy lekami modyfikującymi profil lipidowy, wśród nich najważniejszą pozycję zajęły statyny ze względu na ich skuteczne działanie obniżające promiażdżycową frakcję cholesterolu LDL oraz liczne dowody na zmniejszanie ryzyka chorób sercowo-naczyniowych pod wpływem leczenia. Fibraty są lekami stosowanymi w praktyce klinicznej znacznie dłużej niż statyny. Głównym mechanizmem działania fibratów na lipidy jest obniżanie stężenia triglicerydów oraz wzrost stężenia cholesterolu HDL. Mechanizm działania fibratów związany jest

z aktywacją receptorów określanych jako PPARα (PPARs, *peroxisome proliferator-activated receptors*), które regulują ekspresję genów kluczowych dla metabolizmu lipidów. Postulowany jest udział tych receptorów w transdukcji wielu sygnałów do jądra komórkowego i z tym wiąże się również koncepcja pozalipidowych (plejotropowych) działań fibratów (działanie przeciwzapalne, przeciwzakrzepowe, poprawa tolerancji glukozy), mogących stanowić dodatkowe przesłanki ich działania w prewencji powikłań sercowo-naczyniowych.

Hipertriglicydemia jeszcze do niedawna nie była postrzegana jako niezależny czynnik ryzyka choroby wieńcowej (ChW). Ogłoszone niedawno stanowisko AHA ponownie podkreśla rolę hipertriglicydemii jako ważnego czynnika proaterogenicznego oddziałującego pośrednio poprzez m.in. współistniejące w tym stanie inne zaburzenia lipidowe, takie jak obecność remnantów i białka apo CIII [7].

Mimo że cholesterol LDL pozostaje głównym celem terapii w prewencji chorób sercowo-naczyniowych, to przyjmuje się, że niektóre lipoproteiny bogate w triglicerydy (VLDL) są zdecydowanie aterogenne, mogą więc stanowić odrębny cel terapii hipolipemizującej u osób z wysokim (>200 mg/dl) stężeniem triglicerydów. Stanowisko to znajduje potwierdzenie również w zaleceniach terapeutycznych europejskich i amerykańskich towarzystw naukowych, odnoszących się do postępowania z chorymi w prewencji wtórnej po ostrym zespole wieńcowym oraz w prewencji pierwotnej u chorych z wysokim ryzykiem sercowo-naczyniowym wynikającym z występowania klasycznych czynników ryzyka i współistnienia innych schorzeń, takich jak cukrzyca czy przewlekła choroba nerek.

Epidemiczny wzrost częstości występowania otyłości powoduje, że cukrzyca typu 2 i zespół metaboliczny są jednymi z najważniejszych problemów współczesnej cywilizacji – uważa się, że za 20 lat na cukrzycę będzie chorować powyżej 300 milionów osób na świecie, zespół metaboliczny zaś to dziś problem już 20–30% populacji niektórych krajów (USA, Polska).

Badania nad zastosowaniem fibratów w prewencji pierwotnej i wtórnej toczą się już od lat 70. ubiegłego wieku, początkowo z klofibratem, następnie – w latach 80. i 90. – z fibratami II generacji (gemfibrozyl, bezafibrat, fenofibrat). Fibraty ze względu na swój mechanizm działania stanowią szczególnie atrakcyjną koncepcję terapeutyczną u chorych na cukrzycę typu 2 oraz u pacjentów z otyłością brzuszną i zespołem metabolicznym. W badaniu DAIS (*Diabetes Atherosclerosis Intervention Study*) wykazano korzystny efekt hamowania progresji miażdżycy naczyń wieńcowych pod

wpływem leczenia fenofibratem [8]. W badaniu DAIS wykazano także inny, ważny wpływ ochrony fenofibratu w powikłaniach mikroangiopatycznych cukrzycy – zmniejszenie ryzyka wystąpienia mikroalbuminurii. W badaniu FIELD, opublikowanym w 2005 roku [9], całkowita liczba zdarzeń sercowo-naczyniowych, oceniana jako drugorzędowy punkt końcowy, uległa 11-proc. (znamiennej) redukcji pod wpływem leczenia fenofibratem. Szczególnie korzystny wpływ fenofibratu obserwowano w grupie pacjentów bez choroby wieńcowej (prewencja pierwotna), gdzie osiągnięto wysoce istotną statystycznie redukcję zdarzeń sercowo-naczyniowych w grupie otrzymującej fenofibrat ($p < 0,001$). W badaniu FIELD potwierdzono korzystny wpływ fenofibratu na zmniejszenie ryzyka powikłań mikroangiopatycznych (mikroalbuminuria, retinopatia, amputacje nieurazowe kończyny dolnej) u chorych na cukrzycę typu 2.

Stosowanie statyn u chorych na cukrzycę zmniejsza ryzyko powikłań s-n oraz związaną z nimi umieralność, dlatego podstawowym celem w leczeniu hipolipemizującym u tych chorych w prewencji powikłań sercowo-naczyniowych pozostaje podwyższone stężenie cholesterolu LDL. U większości pacjentów z cukrzycą typu 2 lekiem pierwszego wyboru w leczeniu zaburzeń lipidowych pozostaje statyna. Należy jednak podkreślić, że chociaż statyny obniżają ryzyko s-n o blisko 30%, to jednak jego poziom pozostaje nadal podwyższony. Przyjmuje się, że to utrzymujące się pomimo leczenia statynami zagrożenie jest powiązane z obecnością innych zaburzeń lipidowych (m.in. obniżonym stężeniem cholesterolu HDL, hipertriglicerydemia) – tzw. ryzyko rezydualne (pozostałe). Zastosowanie skojarzonej farmakoterapii zaburzeń lipidowych stanowi podstawę koncepcji zwalczania ryzyka rezydualnego. Istotną rolę odgrywa w tym zakresie połączenie fenofibratu ze statynami. Dlaczego właśnie połączenie tego fibratu?

Zarówno stosowanie statyn, jak i fibratów może wiązać się z ryzykiem działań niepożądanych, w tym powikłań mięśniowych (miopatia). Ryzyko to jest małe w odniesieniu do leczenia skojarzonego fenofibratem ze statynami, jednak, jak pokazuje praktyka, może ulegać istotnemu zwiększeniu przy połączeniu statyn z niektórymi fibratami. Znany przykładem jest wycofanie ceriwastatyny po serii zgonów wywołanych łącznym jej stosowaniem z gemfibrozylem. Wysoki odsetek (32% w grupie placebo i 16% w grupie fenofibratu) chorych w badaniu FIELD pobierał dodatkowo statynę w leczeniu otwartym, co, jak się wydaje, w istotnym stopniu przyczyniło się do zmniejszenia względnej korzyści w grupie leczonej fenofibratem. Jest jednak faktem, że to niezaplanowane

leczenie skojarzone fenofibratem ze statynami było bezpieczne.

ACCORD jest badaniem szczególnym z wielu powodów. Po pierwsze jest jednym z niewielu badań zaprojektowanych i poprowadzonych pod patronatem Narodowego Instytutu Zdrowia USA, a zatem jest badaniem niezależnym od jakiegokolwiek firmy farmaceutycznej. Po drugie koncepcja badania polegała na przetestowaniu hipotezy odnoszącej się do korzyści z intensywnego leczenia hipoglikemizującego, hipotensyjnego i hipolipemizującego w dużej grupie pacjentów z cukrzycą typu 2. Ku zaskoczeniu wielu diabetologów i hipertensjologów intensywne leczenie hipoglikemizujące oraz hipotensyjne nie wiązało się ze spodziewanymi korzyściami w grupie chorych na cukrzycę typu 2. Wyniki m.in. badania ACCORD spowodowały zmianę dotychczasowych zaleceń dotyczących celów terapeutycznych w zakresie HbA1C ($< 7\%$), a w najbliższym czasie najprawdopodobniej ulegnie rewizji cel terapeutyczny w leczeniu hipotensyjnym. W części lipidowej badania ACCORD [10] oceniano wpływ skojarzonej terapii simwastatyną i fenofibratem w dawce 160 mg/dobę lub placebo w grupie ponad 5000 chorych na cukrzycę typu 2. W analizie charakterystyki wyjściowej badanej grupy zwracają uwagę bardzo dobre parametry lipidowe w całej grupie „na wejściu” do badania: średni LDL-C wynosił ok. 100 mg/dl, HDL-C – 38 mg/dl, a średnie stężenie TG – ok. 160 mg/dl. Średnie stężenie HbA1C wynosiło 8,3%, a średnie wartości ciśnienia tętniczego – 134/74 mmHg. 60% chorych otrzymywało już wcześniej leczenie hipolipemizujące statyną. Należy stwierdzić, że grupa badana była bardzo dobrze leczona, co na pewno wpływało na wyjściowy poziom ryzyka s-n w populacji badania ACCORD. Zastosowanie fenofibratu wiązało się z istotnym spadkiem stężenia triglicerydów oraz niewielkim wzrostem stężenia cholesterolu HDL, szczególnie w początkowej fazie obserwacji (stężenia HDL-C nie różniły się istotnie na koniec obserwacji). Wartości LDL-C obniżyły się z ok. 100 mg/dl do 81 mg/dl w obu grupach terapeutycznych na koniec badania. Po okresie obserwacji, wynoszącym średnio prawie 5 lat, nie stwierdzono w całej badanej grupie wpływu leczenia fenofibratem na zaplanowany punkt pierwszorzędowy (8-proc. redukcja ryzyka zawału serca, udaru mózgu lub zgonu z tych przyczyn, $p=0,32$) i drugorzędowe punkty końcowe. **Należy podkreślić, że stosowanie złożonego leczenia hipolipemizującego (statyna + fenofibrat) nie wiązało się w badaniu ACCORD ze wzrostem ryzyka powikłań mięśniowych czy wątrobowych, co potwierdza bezpieczeństwo terapii skojarzonej.** Obserwowany w badaniu ACCORD wzrost stężenia kreatyniny

w grupie przyjmującej fenofibrat jest zjawiskiem znanym i był już opisywany wcześniej. Ze względów bezpieczeństwa w trakcie badania dokonano dodatkowej korekty dawkowania fenofibratu w zależności od stopnia upośledzenia filtracji kłębuszkowej obliczanej wg wzoru MDRD. Niezależnie od wzrostu stężenia kreatyniny zaobserwowano, że leczenie fenofibratem było związane z istotnym korzystnym wpływem na występowanie białkomoczu (podobnie jak w dwóch wspomnianych wcześniej badaniach DAIS i FIELD). W badaniu ACCORD dokonano także analizy wyników w predefiniowanych podgrupach chorych. **Wyniki uzyskane w podgrupie z aterogenną dyslipidemią (stężenie TG >203 mg/dl, HDL <35 mg/dl) zasługują na szczególne zainteresowanie. W tej grupie główny punkt końcowy wystąpił u 17,3% chorych leczonych placebo i u 12,4% chorych leczonych fenofibratem (względna redukcja o 31%), podczas gdy w pozostałej części grupy częstość występowania głównego punktu końcowego była taka sama i wynosiła 10,1% w każdej podgrupie terapeutycznej (fenofibrat v. placebo).**

Jeśli porównamy wyniki badania ACCORD z wynikami wcześniejszych badań nad fibratami, to okaże się, że są one zbieżne. Podobne wyniki i zbliżone korzyści z leczenia fibratami dotyczyły chorych z aterogenną dyslipidemią. W badaniu *Helsinki Heart Study* (HHS) stosowanie w prewencji pierwotnej u 4000 mężczyzn z hipercholesterolemią gemfibrozylu w dawce 2 × 600 mg w porównaniu z placebo przez 5 lat [11] wiązało się ze znamiennej redukcją ryzyka wystąpienia zawału serca zakończonego lub niezakończzonego zgonem o 34% ($p < 0,02$), a w podgrupie z hipertriglicerydemią stopień redukcji ryzyka wyniósł 71%. W badaniu *Bezafibrate Infarction Prevention trial* (BIP), w którym stosowano bezafibrat w dawce 400 mg/dobę lub placebo w prewencji wtórnej u 3090 chorych po zawale serca, uzyskano znamiennej redukcję ryzyka zawału serca (zakończzonego lub niezakończzonego zgonem) oraz ryzyka nagłego zgonu sercowego (ok. 40%) jedynie w stosunkowo niewielkiej podgrupie pacjentów z wyraźnie podwyższonymi stężeniami triglicerydów (powyżej 200 mg/dl). Podobnie, w analizie badania FIELD względnie lepsze wyniki uzyskano w podgrupie z aterogenną dyslipidemią [12].

Jakie powinno być nasze spojrzenie na leczenie zaburzeń lipidowych u chorych na cukrzycę po badaniu ACCORD?

Gdy oceniamy nową opcję terapeutyczną, myślimy zwykle o potencjalnych korzyściach, lecz przede wszystkim liczy się bezpieczeństwo. Stosowanie klofibratu w badaniu WHO zmniejszyło,

co prawda, liczbę incydentów sercowo-naczyniowych, ale powodowało jednocześnie istotny wzrost umieralności ogólnej. Badanie ACCORD potwierdza w sposób jednoznaczny bezpieczeństwo terapii skojarzonej fenofibrat + simwastatyna u pacjentów z cukrzycą.

Obserwacja populacji w badaniach FIELD i ACCORD wskazuje, że obecność aterogenicnej dyslipidemii w podgrupach chorych w obu tych badaniach związana była ze zwiększonym o 30–70% ryzykiem incydentów sercowo-naczyniowych w porównaniu z podgrupami pacjentów bez tych zaburzeń lipidowych [13, 14]. Badanie ACCORD potwierdza rolę fibratów w leczeniu zaburzeń lipidowych, szczególnie u chorych z aterogenną dyslipidemią, co jest zgodne z wynikami innych badań klinicznych oraz standardami postępowania i stanowiskiem wielu towarzystw naukowych [1, 7, 15]. Należy też podkreślić, że wyniki badania ACCORD potwierdzają pogląd, iż efekt terapeutyczny zależy w głównej mierze od parametrów lipidowych i od wpływu na te parametry leków hipolipemizujących.

Podsumowanie

Obecność aterogenicnej dyslipidemii jest związana ze zwiększonym ryzykiem powikłań sercowo-naczyniowych pomimo leczenia statynami – określamy to zjawisko jako ryzyko pozostałe (rezydualne). Skojarzone leczenie fenofibratem i simwastatyną u chorych z cukrzycową aterogenną dyslipidemią w przebiegu cukrzycy typu 2 jest bezpieczne i może wiązać się z dalszym zmniejszeniem ryzyka powikłań sercowo-naczyniowych. Leczenie skojarzone fenofibratem i simwastatyną u chorych z cukrzycą typu 2 wiąże się ze zmniejszeniem ryzyka rozwoju białkomoczu, należy jednak uwzględnić to, że powoduje ono zwiększenie (przemijające) stężenia kreatyniny. Badanie ACCORD potwierdza dotychczasowe wskazania do zastosowania fibratów obejmujące hipertriglicerydemię i aterogenną dyslipidemię skojarzoną z cukrzycą typu 2, zespołem metabolicznym i otyłością brzuszną.

Adres autora

dr n. med. Witold Pikto-Pietkiewicz
Katedra i Klinika Kardiologii Nadciśnienia Tętniczego
i Chorób Wewnętrznych II Wydziału Lekarskiego
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
05-820 Warszawa, ul. Kondratowicza 8
e-mail: witold.pikto-pietkiewicz@wum.edu.pl

Piśmiennictwo:

1. ATP III. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001, 285: 2486-97 [PMID: 11368702].
2. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998, 352: 837-53 [PMID: 9742976].
3. Carroll M.D., Lacher D.A., Sorlie P.D. et al.: Trends in serum lipids and lipoproteins of adults, 1960-2002. *JAMA* 2005, 294: 1773-1781.
4. Flegal K.M., Carroll M.D., Ogden C.L., Johnson C.L.: Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA* 2002, 288: 1723-1727.
5. Pikto-Pietkiewicz W., Wołkowska K., Pasierski T.: Treatment of dyslipidemia in patients with diabetes mellitus. *Pharmacological Reports* 2005, 57(suppl.): 10-19.
6. Pikto-Pietkiewicz W., Pasierski T.: Zaburzenia lipidowe w chorobach nerek. W: *Kardioneurologia*. Pasierski T., Myśliwiec M., Imiela J. (red.). Medical Tribune Polska, Warszawa 2006: 87-100.
7. Miller M., Stone N.J., Ballantyne C. et al.: Triglycerides and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* 2011, 123: 2292-2333.
8. Diabetes Atherosclerosis Intervention Study Investigators: Effect of fenofibrate on progression of coronary artery disease in type 2 diabetes: Diabetes Atherosclerosis Intervention Study, a randomized study. *Lancet* 2001, 357: 905.
9. Keech A., Simes R.J., Barter P. et al.: Effects of long-term fenofibrate therapy on cardiovascular events in 9795 people with type 2 diabetes mellitus (the FIELD study): randomised controlled trial. *Lancet* 2005, 366: 1849-6.
10. The ACCORD Study Group. Effects of Combination Lipid Therapy in Type 2 Diabetes Mellitus [online: 10.1056/nejmoa1001282 nejm.org].
11. Manninen V., Elo O., Frick H. et al.: Lipid alteration and decline in the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *JAMA* 1988, 260: 641-651.
12. The BIP Study Group: Secondary prevention by rising HDL cholesterol and reducing triglycerides in patients with coronary artery disease. The Bezafibrate Infarction Prevention (BIP) study. *Circulation* 2000, 102: 21.
13. Scott R., O'Brien R., Fulcher G., Keech A. et al.; Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) Study Investigators. Effects of fenofibrate treatment on cardiovascular disease risk in 9,795 individuals with type 2 diabetes and various components of the metabolic syndrome: the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study. *Diabetes Care* 2009, 32: 493-498.
14. ACCORD Study Group, Ginsberg H.N., Elam M.B., Lovato L.C. et al.: Effects of combination lipid therapy in type 2 diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.* 2010, 362: 1563-1574.
15. Chapman M.J., Ginsberg H.N., Amarencu P. et al.; w imieniu European Atherosclerosis Society Consensus Panel: Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur. Heart J.* 2011, 32: 1345-1361.

dr n. med. Magdalena Węglarz, prof. dr hab. n. med. Władysław Sinkiewicz,
dr n. med. Joanna Banach, prof. UMK dr hab. n. med. Ewa Żekanowska,
dr n. med. Jan Błazejewski, dr n. med. Robert Bujak

WPŁYW KONSUMPCJI RÓŻNYCH TYPÓW ALKOHOLI NA OSOCZOWE STĘŻENIE CZYNNIKA TKANKOWEGO I JEGO INHIBITORA, SELEKTYNY E, SELEKTYNY P, TROMBOMODULINY I BIAŁKA C U MŁODYCH ZDROWYCH OCHOTNIKÓW PŁCI MĘSKIEJ

THE INFLUENCE OF DIFFERENT TYPES OF ALCOHOL CONSUMPTION
ON TISSUE FACTOR, TISSUE FACTOR PATHWAY INHIBITOR, SELECTINS,
THROMBOMODULIN, AND PROTEIN C PLASMA LEVELS IN YOUNG,
HEALTHY MALE VOLUNTEERS

Streszczenie

Cele: Z dotychczasowych badań wynika, że umiarkowane spożywanie alkoholu, zwłaszcza czerwonego wina, zmniejsza ryzyko zachorowania na zawał serca i zgonu nim spowodowanego. Efekt ten może wynikać z korzystnego wpływu alkoholu na funkcje śródbłonna, układ krzepnięcia i procesy zapalne. Celem badania była ocena osoczkowego stężenia czynnika tkankowego (TF), inhibitora zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia (TFPI), selektyny płytkowej (SP) i śródbłonkowej (SE), trombomoduliny (TM) oraz białka C (PC) po pięciodniowej konsumpcji różnych typów alkoholu lub soku z czarnej porzeczki.

Metody: Grupa badana liczyła 58 zdrowych mężczyzn, abstynentów, w wieku $23,6 \pm 2,2$ roku. Osoby badane miały prawidłowe stężenie lipidów i nie przyjmowały przewlekle leków. Badani zostali zrandomizowani do grup konsumujących po 300 ml: czerwonego wina, białego wina, 14-proc. roztworu etanolu, soku z czarnej porzeczki lub wody. Pomiaru badanych parametrów dokonano 1. dnia przed konsumpcją napojów i 6. dnia, po 5 dniach spożywania napojów.

Wyniki: W grupie konsumującej roztwór etanolu zaobserwowano istotnie wyższe stężenie TF i nieznacznie wyższe TFPI w dniu 6. w stosunku do stężenia wyjściowego. Natomiast u spożywających czerwone wino zaobserwowano istotnie niższe stężenie TFPI i trend do obniżania się TF po konsumpcji napoju. Stężenie SP w osoczu w 6. dniu było niższe niż w 1. dniu u spożywających etanol. Nie stwierdzono zmian stężenia TM,

PC, SE w żadnej z grup. Stężenia badanych parametrów nie uległy zmianie po konsumpcji białego wina, soku z czarnej porzeczki i wody.

Wnioski: Krótkoterminowe spożywanie etanolu przez zdrowych abstynentów może mieć niekorzystny wpływ na hemostatyczne czynniki ryzyka zależne od aktywacji krzepnięcia przez TF. Odmienny od wpływu etanolu wpływ czerwonego wina na stężenie TF i TFPI może być skutkiem korzystnego działania dużej ilości substancji polifenolowych zawartych w winie. Spożywanie etanolu może wpływać na obniżenie osoczkowego stężenia selektyny P, biorącej udział w procesach zapalnych i agregacji płytek krwi.

Słowa kluczowe: alkohol, wino, selektyna P, selektyna E, czynnik tkankowy, TFPI, trombomodulina

Abstract

Purpose: According to moderate alcohol consumption, with special regard to red wine, reduces myocardial infarction morbidity and mortality. This may result from positive influence of alcohol on endothelial function, haemostatic factors, and inflammatory processes. The purpose of the study was to determine tissue factor (TF), tissue factor pathway inhibitor (TFPI), E-selectin (SE), P-selectin (SP), thrombomodulin (TM), and protein C (PC) plasma levels after 5-day consumption of different types of alcohol, blackcurrant juice or water.

Methods: The study group consisted of 58 healthy males, abstainers, aged $23,6 \pm 2,2$ years.

Subjects were normolipemic and did not receive any medications. Subjects were randomized to groups consuming 300 ml of either: red wine, white wine, 14% ethanol solution, blackcurrant juice, or water. Fasting blood samples were collected for testing on day 1 before consumption and on day 6 after commencement of the 5-day alcohol consumption period.

Results: Statistically significant increase in TF and non-significant increase in TFPI plasma level was observed on day 6 in the ethanol group. In the red wine group significant decrease in TFPI and decreasing trend in TF level were observed. Plasma SP level on day 6 was significantly lower

than on day 1 in the ethanol group. No change in TM, PC, SE was observed in any of the groups. White wine, blackcurrant juice, and water had no influence on the tested parameters.

Conclusions: Short-term alcohol consumption by healthy abstainers may have negative, prothrombotic effect dependent on TF. Favorable effect of red wine on TFPI and TF levels may result from positive activity of polyphenolic compounds of red wine. Ethanol consumption may decrease plasma level of SP playing a role in inflammatory processes and platelet aggregation.

Key words: alcohol, wine, P-selectin, E-selectin, tissue factor, TFPI, thrombomodulin

Wstęp

Jak wynika z dużych badań epidemiologicznych, alkohol spożywany w umiarkowanych ilościach przyczynia się do redukcji śmiertelności z powodu choroby niedokrwiennej serca, udaru niedokrwiennej mózgu, nie zwiększając śmiertelności z przyczyn pozanaczyniowych [1–3]. Krzywa zależności ryzyka sercowo-naczyniowego od ilości spożytego alkoholu obserwowana w badaniach epidemiologicznych ma zazwyczaj kształt litery U lub J [1, 2, 4]. Najmniejsze ryzyko zachorowania i zgonu z przyczyn naczyniowych występuje u kobiet konsumujących 1–2 jednostki alkoholu i mężczyzn konsumujących 2–3 jednostki na dobę (jednostka alkoholu rozumiana jest jako równoważność około 250 ml piwa, 150 ml wina lub 30 ml wódki, zawierających średnio 12 g etanolu) [5]. Spośród różnych alkoholi szczególnie korzystne działanie w zapobieganiu chorobom układu krążenia przypisuje się czerwonemu winu, które zawiera dużą ilość substancji polifenolowych [6–8]. Poza umiarkowaną konsumpcją alkoholu i regularną aktywnością fizyczną również codzienne spożywanie warzyw i owoców zmniejsza ryzyko zawału serca [9]. Protekcyjną rolę regularnej konsumpcji warzyw i owoców potwierdzono w wielu badaniach populacyjnych [10–12].

Miażdżyca jest najważniejszą przyczyną zawału serca. Jest to przewlekła choroba naczyń krwionośnych, w rozwoju której rolę odgrywiają procesy zapalne i zakrzepowe, wzajemnie się przeplatające i aktywujące. We wczesnych etapach miażdżycy dochodzi do adhezji monoklonalnych leukocytów do komórek śródbłonna, a potem do ich wędrówki do błony wewnętrznej naczynia. W procesie tym pośredniczą cząstki adhezyjne, między innymi selektyna płytkowa (SP, selek-

tyna P) i śródbłonkowa (SE, selektyna E) [13]. Jawne klinicznie ostre zespoły wieńcowe są następstwem powstania skrzepliny w obrębie blaszki miażdżycowej. Pęknięcie lub owrzodzenie blaszki prowadzi do krzepnięcia, między innymi za pośrednictwem czynnika tkankowego (TF) obecnego w rdzeniu blaszki [14]. W adhezji i agregacji płytek krwi w obrębie pękniętej blaszki miażdżycowej pośredniczy między innymi selektyna P [15]. Nadmiernej aktywności prozakrzepowej przeciwdziała wiele mechanizmów antykoagulacyjnych, których prawidłowe funkcjonowanie w naczyniach objętych miażdżycą najczęściej jest upośledzone. Należą do nich między innymi: układ antykoagulacyjny białka C, złożony z białka C (PC) i trombomoduliny (TM), oraz swoisty inhibitor zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia (TFPI), który hamuje aktywność kompleksu czynnika tkankowego z czynnikami krzepnięcia: VII i X [16, 17].

Celem badania była ocena wpływu spożycia białego wina, czerwonego wina, 14-proc. roztworu etanolu, soku z czarnej porzeczki lub wody na osoczowe stężenie: TF, TFPI, PC, TM, SP i SE.

Materiał i metody

Badanie zostało przeprowadzone wśród 58 ochotników płci męskiej w wieku 23–26 lat. Badani mężczyźni zamieszkiwali internat, mieli ustalony, jednakowy dla wszystkich plan zajęć, podobny rozkład dnia i nocnego wypoczynku oraz wykazywali podobną aktywność fizyczną. Osoby biorące udział w badaniu spożywały pokarmy według jednakowego jadłospisu i o tych samych porach dnia, zarówno w trakcie badania, jak i w okresie trzech miesięcy poprzedzających eksperyment. Badana populacja składała się wyłącznie z mężczyzn niepalących tytoniu, będących

abstynentami. W trakcie całego badania i na dwa tygodnie przed jego rozpoczęciem uczestnicy próby powstrzymywali się od spożywania pokarmów bogatych w substancje polifenolowe.

Kryteria wyłączenia z badania stanowiły: nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, przyjmowanie leków hipolipemizujących i doustnych antykoagulantów, nikotyzm, alkoholizm i inne uzależnienia, dodatni wywiad w kierunku: chorób nowotworowych, przewlekłych procesów zapalnych, choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy, choroby refluksowej przełyku bądź przepukliny rozworu przełykowego, chorób wątroby i innych przewlekłych chorób wymagających farmakoterapii. Z badania wykluczono osoby z istotnie podwyższonymi parametrami lipidowymi oraz nieprawidłowym stężeniem aminotransferazy alaninowej.

Uczestnicy badania zostali losowo przydzieleni do pięciu grup przez pięć kolejnych dni spożywających na czczo odpowiednio po 300 ml: wina białego 14% (chardonnay) (n=11), wina czerwonego 14% (cabernet sauvignon reserve) (n=12), soku z czarnej porzeczki (Hortex) (n=12), wodnego 14-proc. roztworu etanolu (n=10), mineralnej wody niegazowanej (n=13). Pierwszego dnia przed podaniem napojów (pomiar 1) i szóstego dnia, po pięciu dniach konsumpcji napojów (pomiar 2) pobierano krew w celu oznaczenia następujących parametrów: TF, TFPI, PC, TM, SP i SE. Oznaczeń dokonano za pomocą testów immunoenzymatycznych. Pierwszego dnia przed konsumpcją napojów zmierzono ponadto aktywność aminotransferazy alaninowej (ALAT), cholesterolu całkowitego (TC), cholesterolu HDL, cholesterolu LDL, triglicerydów (TG) (za pomocą automatycznych ana-

lizatorów biochemicznych) oraz stężenie białka C-reaktywnego (hsCRP) metodą immunoturbimetryczną bardzo czułą. Każdorazowo pobrania krwi dokonywano w godzinach porannych, dokonując nakłucia żyły okolicy zgięcia łokciowego z minimalnym zastojem żylnym.

Do przeprowadzenia analizy statystycznej posłużono się pakietem statystycznym STATISTICA firmy StatSoft. Testowanie normalności rozkładu wykonano za pomocą testu Shapiro-Wilka oraz klasycznego testu χ^2 -Pearsona. Jednorodność wariancji oceniano testem Levene'a. Zmienne o rozkładzie normalnym opisano przy użyciu średniej arytmetycznej (M) i odchylenia standardowego (SD). Do opisu badanych parametrów o rozkładzie różnym od normalnego posłużono się medianą (Me) i przedziałem międzykwartylowym (IQR) obejmującym 50% wartości centralnych między kwartylem 3. (Q3) a kwartylem 1. (Q1). Do porównania średnich wykorzystano test t-studenta dla zmiennych niezależnych i zmiennych zależnych oraz testy nieparametryczne U Manna-Whitneya i Wilcoxon. Do porównania średnich wielu grup wykorzystano analizę wariancji ANOVA i test Kruskala-Wallisa. W celu zbadania powiązania poszczególnych cech wyznaczono współczynnik korelacji rangowej R Spearmana. Za granicę istotności statystycznej dla wszystkich testów przyjęto poziom p=0,05.

Wyniki

Charakterystyka badanej grupy

Średni wiek w badanej grupie wynosił 23,6 \pm 2,2 roku. Żaden z uczestników badania nie był palaczem papierosów, wszyscy byli abstynentami.

Tabela 1. Średnie wartości wstępnych badań laboratoryjnych i BMI w grupach spożywających pięć różnych napojów.

Parametry badane	Białe wino n=11	Czerwone wino n=12	Roztwór etanolu n=10	Sok z porzeczki n=12	Woda n=13
TC (mg/dl) M (SD)	188,0 (41,1)	174,3 (27,7)	170,9 (32,4) ^b	160,0 (34,7) ^a	212,0 (29,4) ^{ab}
LDL (mg/dl) M (SD)	106,3 (29,8)	94,1 (19,5)	98,8 (23,9)	84,1 (26,7)	131,4 (24,7)
HDL (mg/dl) M (SD)	51,1 (4,1)	54,3 (10,2)	45,7 (8,8)	50,3 (6,1)	53,8 (8,5)
TG (mg/dl) Me (IQR)	84,0 (77,0–103,0)	91,0 (71,0–104,0)	85,0 (69,0–137,0)	84,0 (54,0–110,0)	105,0 (84,0–138,0)
ALAT (U/l) Me (IQR)	22,0 (18,0–38,0)	22,0 (19,0–27,0)	25,0 (20,0–35,0)	20,0 (17,0–26,0)	20,0 (18,0–33,0)
CRP (mg/l) Me (IQR)	0,7 (0,6–2,9)	0,5 (0,2–0,7)	0,5 (0,2–0,8)	0,5 (0,3–0,7)	0,7 (0,5–1,6)
BMI Me (IQR)	24,2 (22,2–27,0)	24,5 (22,5–26,4)	23,8 (22,1–26,7)	24,1 (23,0–24,5)	24,1 (22,7–25,6)

M – średnia, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana, IQR – przedział międzykwartylowy (Q1–Q3), a – p < 0,005, b – p < 0,05.

Dla każdego badanego wyznaczono wskaźnik masy ciała (BMI), definiowany jako stosunek masy ciała w kilogramach do wzrostu w metrach podniesionego do kwadratu. Średnia wartość BMI w badanej grupie wynosiła $24,4 \pm 2,5 \text{ kg/m}^2$. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic średnich wartości BMI między podgrupami.

TF i TFPI

Stwierdzono, że u osób, które spożywały 14-proc. roztwór etanolu przez 5 dni, stężenie TF zmierzone w dniu szóstym (pomiar 2) było istotnie wyższe niż w dniu pierwszym (pomiar 1) ($TF_2=258,75 \text{ pg/ml}$ v. $TF_1=303,7 \text{ pg/ml}$; $p < 0,05$) oraz było istotnie wyższe niż stężenie stwierdzone w 6. dniu badania w pozostałych grupach (spożywający wino czerwone, wino białe, sok porzeczkowy lub wodę). TFPI u konsumujących roztwór etanolu było jedynie nieistotnie wyższe w pomiarze 2 niż w pomiarze 1. W pozostałych badanych podgrupach nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic stężenia TF między pomiarem 1 a pomiarem 2.

Natomiast u osób, które konsumowały czerwone wino, obserwowano istotnie statystycznie niższe stężenie TFPI w pomiarze 2 w porównaniu z pomiarem 1 ($TFPI_2=48,3 \pm 14,4 \text{ ng/ml}$ v. $TFPI_1=58,9 \pm 15,5 \text{ ng/ml}$; $p < 0,005$) oraz nieistotnie niższe stężenie TF.

Pomimo niewątpliwego związku czynnościowego czynnika tkankowego i jego inhibitora w badaniu stwierdzono jedynie nieistotną, dodatnią korelację ich stężeń oznaczonych wyjściowo. Natomiast wzrost stężenia TF wykazywał dodatnią korelację z przyrostem stężenia TFPI u konsumujących napoje alkoholowe ($R=0,37$; $p < 0,05$).

Wykazano również istotną, dodatnią korelację między stężeniem TFPI a stężeniem cholesterolu HDL ($R=0,3$; $p < 0,05$). Dodatnia zależność między TFPI a stężeniem cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL i triglicerydów nie osiągnęła istotności statystycznej.

Selektyna P i selektyna E

Porównanie stężenia selektyny P w osoczu w pomiarze 1 i w pomiarze 2 wykazało, że w grupie osób, które konsumowały 14-proc. roztwór etanolu, średnie stężenie selektyny P było istotnie statystycznie niższe w pomiarze 2 ($SP_2=95,60 \pm 26,54 \text{ ng/ml}$ v. $SP_1=112,96 \pm 28,66 \text{ ng/ml}$; $p < 0,05$). W pozostałych podgrupach stężenia selektyny P nie różniły się na początku i na końcu badania. Stężenia selektyny E na początku i na końcu eksperymentu nie różniły się istotnie w żadnej z badanych podgrup.

Trombomodulina i białko C

Porównanie osoczowych stężeń trombomoduliny i aktywności białka C, oznaczonych w dniu pierwszym, z wartościami zmierzonymi w dniu szóstym nie wykazało istnienia statystycznie istotnej różnicy między tymi stężeniami w żadnej z badanych podgrup spożywających jeden z pięciu napojów.

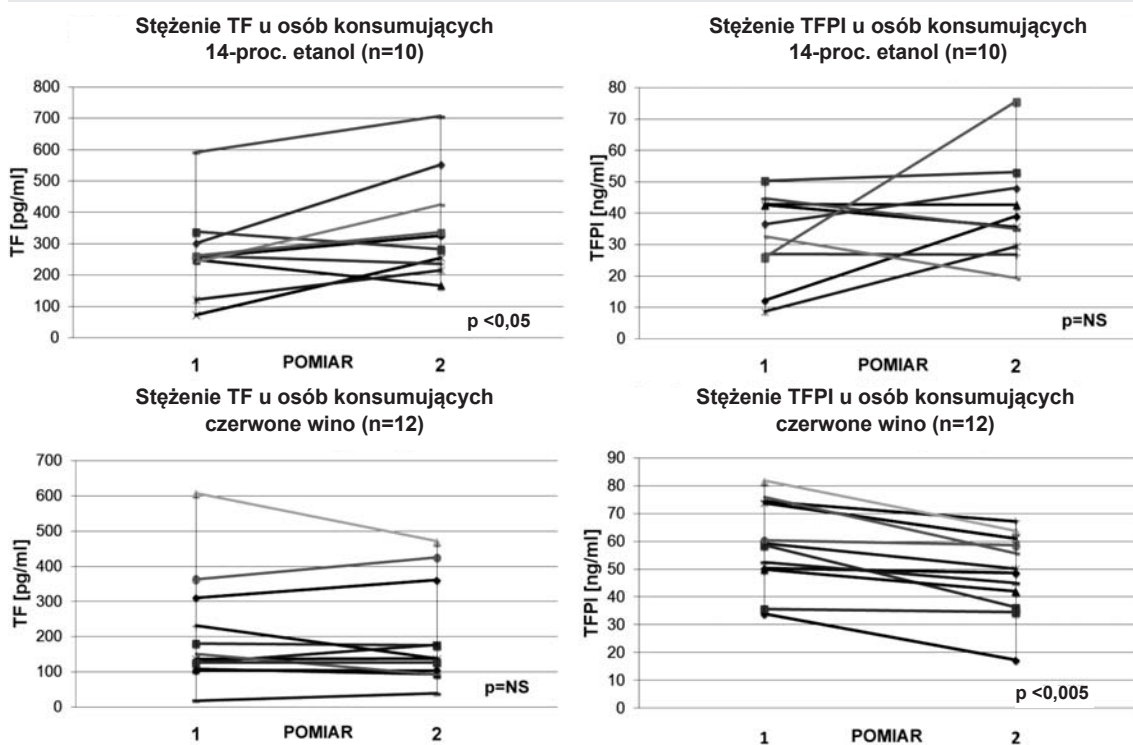
W dalszym etapie analizy dokonano porównania stężeń badanych parametrów między osobami z grupy spożywającej napoje z alkoholem ($n=33$) i osobami spożywającymi napoje bezalkoholowe ($n=25$). Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy stężenia: TF, TFPI, SP i SE, oraz aktywności PC między pomiarem 1 a pomiarem 2 zarówno u spożywających napoje z alkoholem, jak i u spożywających napoje bezalkoholowe.

Tabela 2. Porównanie średnich osoczowych stężeń TF i TFPI w dniu pierwszym przed spożyciem (pomiar 1) i w dniu szóstym, po pięciu dniach spożywania badanych napojów (pomiar 2).

	Stężenie TF (pg/ml)			Stężenie TFPI (ng/ml)		
	Pomiar 1 Me (IQR)	Pomiar 2 Me (IQR)	p	Pomiar 1 M (SD)	Pomiar 2 M (SD)	p
Czerwone wino n=12	143,2 (116,5–270,9)	137,1 ^a (98,5–269,0)	NS	58,9 (15,5)	48,3 (14,4)	$p < 0,005^*$
Białe wino n=11	161,9 (110,9–315,0)	203,1 ^b (153,1–268,5)	NS	60,3 (21,9)	50,4 (19,9)	NS
Roztwór etanolu n=10	258,8 (241,6–301,4)	303,7 ^{abc} (235,7–424,7)	$p < 0,05^*$	32,4 (13,9)	40,5 (15,9)	NS
Sok z porzeczki n=12	135,0 (83,6–246,8)	102,03 ^c (86,8–194,4)	NS	49,1 (14,0)	54,5 (14,1)	NS
Woda n=13	181,0 (151,7–277,4)	278,9 (157,5–351,3)	NS	53,8 (23,8)	54,2 (28,4)	NS

* – wartość istotna statystycznie, M – średnia, SD – odchylenie standardowe, Me – mediana, IQR – przedział międzykwartylowy (Q1–Q3), a – $p < 0,05^*$, b – $p < 0,05^*$, c – $p < 0,005^*$

Rycina 1. Zmiany wartości stężenia TF i TFPI między pomiarem 1 (w dniu pierwszym przed podaniem napoju) i pomiarem 2 (w dniu szóstym, po 5 dniach podawania napoju) w grupach konsumujących czerwone wino lub etanol (profile przypadków).



Omówienie

Z uwagi na problemy etyczne i społeczne dotyczące badania wpływu alkoholu na organizm ludzki większość opublikowanych badań eksperymentalnych przeprowadzono *in vitro*, natomiast badania *in vivo* wykonano w nielicznych, obejmujących zwykle kilkanaście osób grupach, które nie zawsze były jednorodne. W badaniu własnym grupa osób została starannie dobrana pod względem wieku i płci, podobnego rozkładu dnia, nocnego wypoczynku oraz aktywności fizycznej. Dieta badanych w okresie eksperymentu była jednakowa, z ograniczeniem spożycia warzyw i owoców, a badane osoby zwyczajowo nigdy nie piły alkoholu ani nie paliły tytoniu.

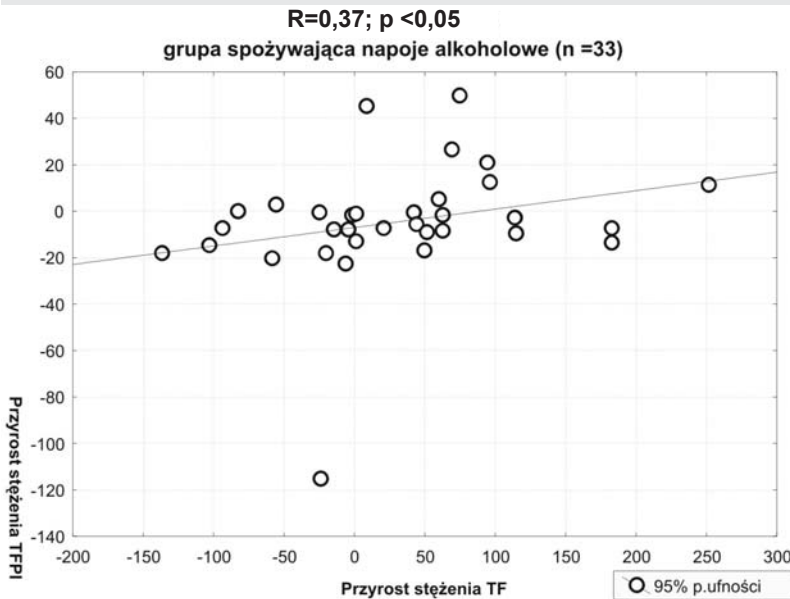
Ocena zmian stężeń TF i TFPI

W badaniu stwierdzono istotnie wyższe stężenie TF i nieistotny wzrost TFPI po pięciu dniach konsumpcji 14-proc. etanolu. U mężczyzn pijących czerwone wino zaobserwowano natomiast istotnie niższe stężenie TFPI i trend w kierunku obniżania TF w osoczu po 5 dniach konsumpcji napoju.

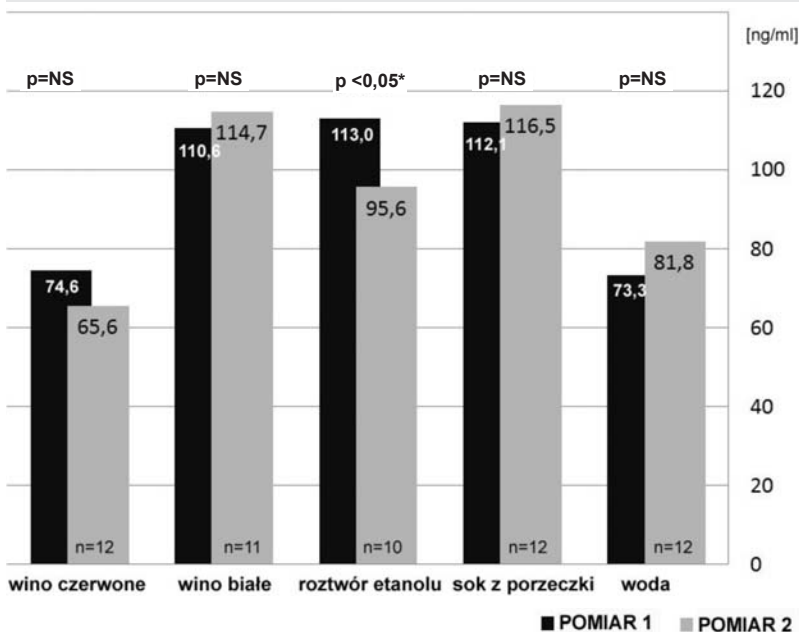
Umiarkowane spożywanie alkoholu korzystnie wpływa na zmniejszanie aktywności prozakrzepowej [18–20]. Jednak działanie to zależy nie tylko od ilości spożytego alkoholu i jego rodzaju, ale również od rozłożenia konsumpcji w czasie. W wielu badaniach stwierdzono, że okazjne spożywanie dużych ilości napojów alkoholowych,

zw. *binge drinking*, związane było z większym ryzykiem wystąpienia zgonu lub choroby niedokrwiennej serca. Natomiast regularne wypijanie małych dawek alkoholu powodowało istotny statystycznie efekt kardioprotekcyjny [21–23]. W wielkiej populacyjnej analizie amerykańskiej udowodniono, że występowanie epizodów nadużywania alkoholu może osłabiać korzystny wpływ spożywania generalnie małych i umiarkowanych ilości alkoholu na śmiertelność wywołaną chorobą wieńcową u kobiet [24]. Protokół obecnego badania własnego zakładał spożycie stosunkowo dużych ilości alkoholu (42 g/d) w krótkim czasie przez abstynentów. Możliwe, że obserwowany wzrost stężenia TF w grupie konsumującej etanol przez 5 dni może tłumaczyć niekorzystne efekty *binge drinking*. Jak wskazuje wiele badań, taki model konsumpcji alkoholu sprzyja zakrzepicy. Jednym z mechanizmów niekorzystnego wpływu nieregularnej konsumpcji alkoholu na procesy zakrzepowe może być upośledzenie fibrylizy i zwiększona aktywacja płytek krwi [25, 26]. Nie zbadano dotychczas, w jaki sposób *binge drinking* wpływa na stężenie czynnika tkankowego i jego inhibitora. W badaniu Dimmitt i wsp. [27] nie stwierdzono, aby zwiększenie dawki alkoholu (z 13 ml/d do 58 ml/d), przyjmowanego w postaci piwa, miało wpływ na stężenie TFPI. Autorzy zaobserwowali jedynie zwiększenie stężenia czynnika VII oraz relatywnie większy wzrost inhibitora aktywatora

Rycina 2. Korelacja między przyrostem stężenia TFPI a przyrostem stężenia TF w czasie badania u osób spożywających napoje alkoholowe.



Rycina 3. Porównanie średnich wartości stężenia selektywny P w osoczu w dniu pierwszym przed spożyciem (pomiar 1) i w dniu szóstym, po pięciu dniach spożywania napoju (pomiar 2).



plazminogenu typu 1 (PAI-1) niż samego aktywatora plazminogenu (tPA).

Wydaje się dość prawdopodobne, że stwierdzone w obecnym badaniu, odmienne od działania etanolu działanie czerwonego wina może wynikać z korzystnego wpływu substancji polifenolowych zawartych w winie. Pendurthi i wsp. [28, 29] wykazali, że resweratrol, charakterystyczny polifenol win, wywiera hamujący wpływ na produkcję TF przez komórki śródbłonna i monocyty stymulowane czynnikami zapalnymi poprzez zahamowanie transkrypcji jego genu. W innym badaniu, u świń na diecie promiażdżycowej zaobserwowano zahamowanie ekspresji mRNA czynnika tkankowego

na pobudzonych monocytach u wszystkich zwierząt otrzymujących czerwone wino w porównaniu ze zwierzętami nieotrzymującymi wina [18]. Wykazano również, że poza resweratolem również inne polifenole mają hamujący wpływ na ekspresję TF [30, 31]. Stopień zahamowania ekspresji TF zależał od dawki polifenoli w roztworze [32].

Nie znamy dotychczas wpływu czerwonego wina i jego polifenoli na stężenie inhibitora zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia. TFPI w surowicy występuje w formie wolnej lub związanej z lipoproteinami, głównie z LDL [33], istnieje hipoteza, że stężenie TFPI w osoczu wzrasta w odpowiedzi na zwiększenie stężenia lipidowych i hemostatycznych markerów miażdżycy, przede wszystkim TF [34]. W obecnym badaniu własnym stwierdzono istotną, dodatnią korelację stężenia TFPI ze stężeniem cholesterolu HDL i nieistotną ze stężeniem: TC, LDL i TG. Z dotychczasowych badań wynika, że leczenie hipercholesterolemii powoduje zmniejszenie osocznego stężenia całkowitego TFPI oraz kompleksu TFPI/Xa [35, 36]. Dowiedziono również, że konsumpcja wina wpływa na obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego, cholesterolu LDL i podwyższenie stężenia cholesterolu HDL [37–39]. Być może istnieje związek między zmianami stężenia cholesterolu i jego frakcji w odpowiedzi na spożycie wina a zmniejszeniem stężenia TFPI.

Zazwyczaj w odpowiedzi na zwiększenie stężenia czynnika tkankowego obserwuje się również zwiększenie stężenia jego inhibitora, chociaż wzrost TFPI może być nieproporcjonalnie mniejszy do wzrostu stężenia TF, gdyż, jak wynika z badań, za inaktywację czynnika tkankowego odpowiada nie tylko TFPI, który hamuje kompleks TF-VIIa-Xa, ale także inne substancje [40]. O nie-

zależnej różnicy stężeń obu parametrów może decydować także różny czas ich trwania w osoczu. Po uwolnieniu do osocza czynnik tkankowy może być wykrywany po kilkudziesięciu godzinach, natomiast czas półtrwania TFPI wynosi zaledwie kilka minut [41].

Ocena zmian stężenia selektyny P i selektyny E

Głównym źródłem wolnej selektyny P w osoczu są pobudzone płytki krwi, a tylko niewielka część pochodzi z komórek śródbłonna. Według niektórych badaczy stężenie selektyny P może być markerem aktywacji płytek, a jej stężenie w osoczu koreluje dodatnio z wielkością ekspresji na płytkach krwi [42]. Poza rolę w adhezji i agregacji płytek SP uczestniczy w wędrowce leukocytów przez ścianę naczyń [43].

Dotychczas przeprowadzono nieliczne badania dotyczące wpływu alkoholu na stężenie selektyny P. Natomiast wpływ alkoholu na aktywację płytek jest stosunkowo dobrze poznany. W eksperymencie Vazquez-Agell i wsp. [44] stężenie SP i SE uległo obniżeniu po 28 dniach spożywania ginu i wina. Pellegrini i wsp. [45] wykazali, że po 4 tygodniach konsumpcji etanolu lub czerwonego wina dochodzi do hamowania agregacji płytek. Także w badaniu Ruf i wsp. [46] roztwór etanolu, wina czerwonego lub wina białego powodował zahamowanie agregacji płytek krwi w przybliżeniu o 70%. Udowodniono, że dezalkoholizowane czerwone wino również zmniejsza ekspresję markerów aktywacji płytek, w tym selektyny P [47]. Zarówno etanol, jak i substancje polifenolowe (resweratrol i kwercetyna) mogą mieć zdolność hamowania kaskady kwasu [48].

O wpływie alkoholu na płytki może decydować nie tylko jego rodzaj, ale również podana dawka alkoholu, a także czas, jaki minął od podania alkoholu do momentu pobrania próbki do badania. We wspomnianym już eksperymencie Ruf i wsp. [46] stwierdzono zahamowanie agregacji płytek zarówno przez etanol, jak i przez wino. Jednak po zaprzestaniu podawania napojów, po 18 godzinach stwierdzono zwiększenie aktywacji płytek krwi u otrzymujących etanol i białe wino, natomiast zmniejszenie aktywacji płytek w grupie otrzymującej czerwone wino. Tak odmienny efekt działania czerwonego wina od efektu pozostałych napojów może wynikać z addycyjnego do etanolu wpływu dużej ilości zawartych w nim polifenoli. Niekorzystne, prozakrzepowe działanie etanolu może być spowodowane również tzw. „reakcją z odbicia”. Według części badaczy etanol wykazuje działanie antypłytkowe tylko wtedy, gdy jest obecny we krwi, a efekt ten nie utrzymuje się, gdy stężenie etanolu spada. Takie działanie „z odbi-

cia” może odpowiadać za powikłania ostrego spożycia alkoholu, np. udar mózgu i nagły zgon sercowy. W badaniu własnym zmniejszenie stężenia selektyny P, mogące świadczyć o zahamowaniu aktywacji płytek u konsumujących etanol, stwierdzono blisko dobę od spożycia ostatniej dawki alkoholu. Nie wiadomo natomiast, jak zachowywało się stężenie selektyny P w kilkadziesiąt minut, czy w kilka godzin po spożyciu napojów. Ponadto badane napoje spożywane były przez kilka kolejnych dni, co także mogło mieć wpływ na otrzymane wyniki.

Selektyna P i selektyna E pośredniczą w migracji monocytów do ściany naczyń, przez co przyczyniają się do progresji miażdżycy. W badaniu Imhof i wsp. [49] stwierdzono, że spożywanie etanolu lub roztworu dezalkoholizowanego wina czerwonego hamuje migrację leukocytów. Udowodniono również, że resweratrol hamuje odpowiedź komórek na PDGF wytwarzany przez pobudzone płytki krwi, przez co ogranicza podtrzymywanie reakcji zapalnej [50]. Mimo że w badaniu własnym nie stwierdzono związku stężenia selektyny E ze spożywaniem napojów alkoholowych, liczne dane wskazują, że zarówno alkohol, jak i polifenole czerwonego wina mogą powodować obniżenie stężenia selektyny E [51–53]. Z kolei obserwacja grupy alkoholików wykazała, że charakteryzują się oni podwyższonym stężeniem selektyny E i ICAM-1, co może świadczyć o aktywacji zapalnej śródbłonna przez przewlekłe nadużywanie alkoholu [54].

W badaniu własnym nie stwierdzono istotnych zmian aktywności białka C po konsumpcji któregośkolwiek z 5 badanych napojów. Podobnie jak w obecnym eksperymencie, Mezzano i wsp. [55] w swoim badaniu nie stwierdzili wpływu trzydziestodniowej konsumpcji 240 ml czerwonego wina na stężenie białka C. Badanie obserwacyjne Woodwarda i wsp. [56] wykazało istnienie dodatkowej korelacji między stężeniem białka S a spożywaniem alkoholu, natomiast stężenie białka C w surowicy było jedynie nieznamienne niższe u konsumujących alkohol w umiarkowanych ilościach niż u pozostałych badanych. Odwrotną zależność między ilością konsumowanego etanolu a stężeniem TM obserwowano w badaniu ARIC [57].

Pomimo sugerowanej w badaniach populacyjnych korzystnej roli owoców w zapobieganiu chorobom układu krążenia, u osób spożywających sok z czarnej porzeczki przez 5 dni nie zaobserwowano zmian stężenia badanych parametrów.

Podsumowanie

Udowodnione w badaniach populacyjnych korzystne efekty regularnego spożywania alkoholu

odnoszą konsumującą około 1–3 drinków dziennie. Istnieją jednak wątpliwości dotyczące niejednorodnego wpływu alkoholu na chorobę wieńcową lub udar mózgu u osób pijących okazjonalnie i u całkowitych abstynentów oraz znaczenia różnych wzorców spożywania alkoholu. Uwzględnienie tylko całkowitej ilości spożywanego alkoholu może przesłaniać inne istotne zmienne, takie jak rodzaj, częstość spożywania alkoholu, średnia ilość spożywanego alkoholu, epizody nadużycia alkoholu, co utrudnia jednoznaczną ocenę wpływu tych zmiennych na ryzyko sercowo-naczyniowe. W ujęciu populacyjnym potencjalne korzyści zdrowotne wiążące się ze spożywaniem umiarkowanych dawek alkoholu są ograniczone przez niekorzystne efekty społeczne, biologiczne i psychologiczne wynikające z nadużywania tego trunku. W związku z licznymi działaniami niepożądanymi nie należy spodziewać się, że w przyszłości przeprowadzone zostaną wielkie badania eksperymentalne, które pozwoliłyby wyjaśnić wewnątrzustrojowe mechanizmy działania alkoholu. Większość dotychczasowych eksperymentów przeprowadzono na niewielkiej grupie badanych i zazwyczaj przez krótki czas. Także podczas planowania obecnego badania nie uniknięto tych ograniczeń. Jednak podkreślić należy, że badana grupa była wyjątkowo jednorodna pod względem płci, wieku, podobnej diety, aktywności fizycznej, palenia tytoniu, a wszyscy badani byli abstynentami w okresie poprzedzającym badanie.

Wnioski

1. Krótkoterminowe spożywanie etanolu przez zdrowych abstynentów może mieć niekorzystny wpływ na hemostatyczne czynniki ryzyka zależne od aktywacji krzepnięcia przez czynnik tkankowy.
2. Odmienny od wpływu etanolu wpływ spożywania czerwonego wina na stężenie czynnika tkankowego i inhibitora zależnej od czynnika tkankowego drogi krzepnięcia może być skutkiem korzystnego działania dużej ilości substancji polifenolowych zawartych w winie.
3. Spożywanie etanolu może wpływać na obniżenie osocznego stężenia selektyny P, biorącej udział w procesach zapalnych i agregacji płytek krwi.
4. U osób spożywających sok z czarnej porzeczki nie obserwuje się zmian osocznego stężenia czynnika tkankowego i jego inhibitora, selektyny płytkowej i śródbłonkowej, białka C oraz trombomoduliny.

Adres do korespondencji:

dr n. med. Magdalena Węglarz
prof. dr hab. n. med. Władysław Sinkiewicz
II Katedra Kardiologii, Szpital Uniwersytecki nr 2
im. Jana Bizuela
85-168 Bydgoszcz, ul. Ujejskiego 75
tel.: (52) 365-56-86, 365-56-53
e-mail: magdamon@wp.pl, wsinkiewicz@cm.umk.pl

Piśmiennictwo:

1. Doll R., Peto R., Hall E. et al.: Mortality in relation to consumption of alcohol: 13 years' observations on male British doctors. *BMJ* 1994, 309: 911-918.
2. Gaziano J.M., Gaziano T.A., Glynn R.J. et al.: Light-to-moderate alcohol consumption and mortality in the Physicians' Health Study Enrollment Cohort. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000, 35: 96-105.
3. Dufour M.C.: What is moderate drinking? Defining "drinks" and drinking levels. *Alcohol Research and Health* 1999, 23: 5-14.
4. Maraldi C., Volpato S., Kritchevsky S.B. et al.: Impact of inflammation on the relationship among alcohol consumption, mortality, and cardiac events. The health, aging, and body composition study. *Arch. Intern. Med.* 2006, 166: 1490.
5. Mamcarz A., Podolec P., Pająk A. et al.: Konsensus rady redakcyjnej Polskiego Forum Profilaktyki Chorób Układu Krążenia dotyczący znaczenia alkoholu w profilaktyce chorób układu krążenia. *Forum Profilaktyki* 2006, 1: 1.
6. Renaud S.C., de Lorgeril M.: Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 1992, 339: 1523-6.
7. Klatsky A.L., Friedman G.D., Armstrong M.A. et al.: Wine, liquor, beer and mortality. *Am. J. Epidemiol.* 2003, 158: 585-595.
8. Gronbaek M., Deis A., Sorensen T.I.A. et al.: Mortality associated with moderate intakes of wine, beer or spirits. *BMJ* 1995, 310: 1165-1169.
9. Yusuf S., Hawken S., Ounpuu S. et al.: Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004, 364: 937-52.
10. Pantogiotakos D.B., Pitsavos C., Kokkinos P. et al.: Consumption of fruits and vegetables in relation to the risk of developing acute coronary syndromes; the CARDIO2000 case cohort study. *Nutr. J.* 2003, 2: 2.
11. Dauchnet L., Ferries J., Arveiler D. et al.: Frequency of fruit and vegetable consumption and coronary heart disease in France and Northern Ireland: the PRIME study. *Br. J. Nutr.* 2004, 92: 963-72.
12. Bazzano L.A., He J., Ogden L.G. et al.: Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2002, 76: 93-9.
13. Weber C., Schober A., Zernecke A.: Chemokines: key regulators of mononuclear cell recruitment in atherosclerotic vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004, 24: 1997-2008.
14. Fuster V., Moreno P.R., Zahi A.F. et al.: Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005, 46: 937-54.

- 15.** Harrison P., Mackie I., Mathur A. et al.: Platelet hyper-function in acute coronary syndromes. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2005, 16: 557-62. **16.** Steffel J., Luscher T.F., Tanner F.C.: Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical implications. *Circulation* 2006, 113: 722-731. **17.** van de Wouwer M., Conway E.M.: Novel functions of thrombomodulin in inflammation. *Crit. Care Med.* 2004, 32: S254-61. **18.** Casani L., Segales E., Vilahur G. et al.: Moderate daily intake of red wine inhibits mural thrombosis and monocyte tissue factor expression in an experimental model. *Circulation* 2004, 110: 460-465. **19.** Mukamal K.J., Jadhav P.P., D'Agostino R.B. et al.: Alcohol consumption and haemostatic factors. Analysis of the Framingham Offspring Cohort. *Circulation* 2001, 104: 1367-1373.
- 20.** Meade T.W., Vickers M.V., Thompson S.G. et al.: Epidemiological characteristics of platelet aggregability. *Br. Med. J.* 1985, 290: 428-432. **21.** Murray R.P., Connett J.E., Tyas S.L. et al.: Alcohol volume, drinking pattern, and cardiovascular disease morbidity and mortality: is there a U-shaped function? *Am. J. Epidemiol.* 2002, 155: 242-8. **22.** Nicholson A., Bobak M., Murphy M. et al.: Alcohol consumption and increased mortality in Russian men and women: a cohort study based on the mortality of relatives. *Bull. World Health Organ.* 2005, 83: 812-819. **23.** Snow W.M., Murray R., Ekuma O. et al.: Alcohol use and cardiovascular health outcomes: a comparison across age and gender in the Winnipeg Health and Drinking Survey Cohort. *Age Ageing* 2009, 38: 206-12. **24.** Mukamal K.J., Chen C.M., Rao S.R. et al.: Alcohol consumption and cardiovascular mortality among US adults, 1987 to 2002. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010, 55: 1328-1335.
- 25.** van de Wiel A., van Golde P.M., Kraaijenhagen R.J. et al.: Acute inhibitory effect of alcohol on fibrinolysis. *Eur. J. Clin. Invest.* 2001, 31: 164-170. **26.** McKee M., Britton A.: The positive relationship between alcohol and heart disease in Eastern Europe: potential physiological mechanisms. *J. R. Soc. Med.* 1998, 91: 402-7. **27.** Dimmitt S.B., Rakic V., Puddey I.B. et al.: The effects of alcohol on coagulation and fibrinolytic factors: a controlled trial. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 1998, 9: 39-45. **28.** Pendurthi U.R., Williams J.T., Rao L.V.: Resveratrol, a polyphenolic compound found in wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: A possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999, 19: 419-26. **29.** Pendurthi U.R., Meng F., Mackman N. et al.: Mechanism of resveratrol-mediated suppression of tissue factor gene expression. *Thromb. Haemost.* 2002, 87: 155-62.
- 30.** Pendurthi U.R., Rao V.M.: Effects of wine phenolics and stibene analogues on tissue factor expression in endothelial cells. *Thromb. Res.* 2002, 106: 205-211. **31.** Kaur G., Roberti M., Raul F. et al.: Suppression of human monocyte tissue factor induction by red wine phenolics and synthetic derivatives of resveratrol. *Thromb. Res.* 2007, 119: 247-56. **32.** Blann A.D., Steele C., McCollum C.N.: The influence of smoking on soluble adhesion molecules and endothelial cell markers. *Thromb. Res.* 1997, 85: 433-438. **33.** Petersen L.C., Valentin S., Hedner U.: Regulation of the extrinsic pathway system in health and disease: the role of factor VIIa and tissue factor pathway inhibitor. *Tromb. Res.* 1995, 79: 1-47. **34.** Hansen J.B., Grimsgaard S., Huseby N. et al.: Serum lipids and regulation of tissue factor-induced coagulation in middle-aged men. *Thromb. Res.* 2001, 102: 3-13.
- 35.** Hansen J.B., Huseby K.R., Huseby N.E. et al.: Effect of cholesterol lowering on intravascular pools of TFPI and its anticoagulant potential in type II hyperlipoproteinemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995, 15: 879-85. **36.** Malyszko J., Malyszko J.S., Hryszko T. et al.: Influence of simvastatin on aspects of thrombogenesis in CAPD patients. *Perit. Dial. Int.* 2003, 23: 260-6. **37.** Cartron E., Fouret G., Carbonneau M.A. et al.: Red-wine beneficial long-term effect on lipids but not on antioxidant characteristics in plasma in a study comparing three types of wine-description of two O-methylated derivatives of gallic acid in humans. *Free Radic. Res.* 2003, 37: 1021-35. **38.** Avellone G., Di Garbo V., Campisi D. et al.: Effect of moderate Sicilian red wine consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2006, 60: 41-7. **39.** Naissides M., Mamo J.C., James A.P. et al.: The effect of chronic consumption of red wine on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *Atherosclerosis* 2006, 185: 438-445.
- 40.** Camerer E., Kolosto A., Prydz H.: Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb. Res.* 1996, 81: 1-41. **41.** Golino P., Ragni M., Cimmino G. et al.: Role of tissue factor pathway inhibitor in the regulation of tissue factor-dependent blood coagulation. *Cardiovasc. Drug Rev.* 2002, 20: 67-80. **42.** Kosteljik E.H., Fijnheer R., Nieuwenhuis H.K. et al.: Soluble P-selectin as a parameter for platelet activation during storage. *Thromb. Haemost.* 1996, 76: 1086-9. **43.** Gawaz M., Langer H., May A.E.: Platelets in inflammation and atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 2005, 115: 3378-84. **44.** Vázquez-Agell M., Sacanella E., Tobias E. et al.: Inflammatory markers of atherosclerosis are decreased after moderate consumption of cava (sparkling wine) in men with low cardiovascular risk. *J. Nutr.* 2007, 137: 2279-84.
- 45.** Pellegrini N., Pareti F.I., Stabile F. et al.: Effects of moderate consumption of red wine on platelet aggregation and haemostatic variables in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1996, 50: 209-13. **46.** Ruf J.C., Berger J.L., Renaud S.: Platelet rebound effect of alcohol withdrawal and wine drinking in rats. Relation to tannins and lipid peroxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1995, 15: 140-4. **47.** Rein D., Paglieroni T.G., Pearson D.A. et al.: Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *J. Nutr.* 2000, 130: 2120S-6S. **48.** Pace-Asciak C.R., Hahn S., Diamandis E.P. et al.: The red phenolic trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta* 1995, 235: 207-19. **49.** Imhof A., Blagieva R., Marx N. et al.: Drinking modulates monocyte migration in healthy subjects: a randomised intervention study of water, ethanol, red wine and beer with or without alcohol. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 2008, 5: 48-53.
- 50.** Sparwel J., Vantler M., Caglayan E. et al.: Differential effects of red and white wines on inhibition of the platelet-derived growth factor receptor: impact of the mash fermentation. *Cardiovasc. Res.* 2009, 81: 758-70. **51.** Sacanella E., Vázquez-Agell M., Mena M.P. et al.: Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy women: a randomized trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 2007, 86: 1463-9. **52.** Pendurthi U.R., Rao L.V. et al.: Resveratrol suppresses agonist-induced monocyte adhesion to cultured human endothelial cells. *Thromb. Res.* 2002, 106: 243-8. **53.** Saeed R.W., Varma S., Peng T. et al.: Ethanol blocks leucocyte recruitment and endothelial cell activation in vivo and in vitro. *J. Immunol.* 2004, 173: 6376-83. **54.** Sacanella E., Estruch R., Badin E. et al.: Chronic alcohol consumption increases serum levels of circulating endothelial cell/leucocyte adhesion molecules E-selectin and ICAM-1. *Alcohol Alcohol* 1999, 34: 678-84.
- 55.** Mezzano D.: Distinctive effects of red wine and diet on haemostatic cardiovascular risk factors. *Biol. Res.* 2004, 37: 217-24. **56.** Woodward M., Lowe G.D., Rumley A. et al.: Epidemiology of coagulation factors, inhibitors and activation markers: The Third Glasgow MONICA Survey. Relationship to cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. *Br. J. Haematol.* 1997, 97: 785-97. **57.** Salomaa V., Matei C., Aleksic M. et al.: Soluble thrombomodulin as a predictor of incident coronary heart disease and symptomless carotid artery sclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: a case cohort study. *Lancet* 1999, 353: 1729-34.

lek. Małgorzata Kieć-Klimczak, dr n. med. Beata Kieć-Wilk, dr n. med. Anna Polus,
mgr inż. dietetyk Dominika Siedlecka, mgr inż. dietetyk Paulina Jamrozik,
dr n. med. Anna Chudy, dr n. biol. Ewa Stępień, dr hab. n. biol. Iwona Wybrańska,
dr hab. n. med. Małgorzata Malczewska-Malec

HIPERGLIKEMIA, „PAMIĘĆ METABOLICZNA” I ROZWÓJ NACZYNIOWYCH POWIKŁAŃ CUKRZYCY

HYPERGLYCEMIA, „METABOLIC MEMORY” AND DEVELOPMENT
OF VASCULAR DIABETES COMPLICATIONS

Streszczenie

Cukrzyca, zarówno typu 1, jak i typu 2, jest chorobą przewlekłą, trwającą wiele lat, często związaną z licznymi powikłaniami, głównie naczyniowymi. Jest to schorzenie dotyczące dużej części populacji świata, z tego powodu jest tak ważnym problemem społecznym. Czynniki środowiskowe, m.in. dieta, ekspozycja na stany hiperglikemii i hiperlipemii, są związane z etiologią cukrzycy i jej powikłań mikro- i makronaczyniowych. Te powikłania są główną przyczyną śmiertelności z powodu cukrzycy. Wyniki dużych prospektywnych badań klinicznych (DCCT-EDIC, UKPDS) sugerują, że powikłania cukrzycowe przypisywane źle wyrównanej gospodarce węglowodanowo-lipidowej jeszcze przed rozpoznaniem cukrzycy mogą pojawić się długo po normalizacji glikemii u chorych w trakcie leczenia hipoglikemizującego. Zjawisko to jest tłumaczone tzw. efektem „pamięci metabolicznej” lub „efektem dziedziczenia”. Pierwsze doniesienia na temat tego efektu pojawiły się ponad 20 lat temu, a prace nad etiologią i mechanizmem tego zjawiska trwają do chwili obecnej. Interesujący jest fakt, że przemijająca ekspozycja na hiperglikemię powoduje trwałe, epigenetyczne modyfikacje prowadzące do zmiany struktury chromatyny i ekspresji genów, związanych z zaburzeniami metabolicznymi w cukrzycy.

Słowa kluczowe: hiperglikemia, pamięć metaboliczna, metylacja histonów, powikłania naczyniowe cukrzycy

Abstract

Diabetes mellitus type 1 and 2 is chronic disease, which persists many years. It is connected with many mainly vascular complications. Predominant part of human's world population suffers from diabetes, that is why diabetes is an urgent public health problem. Environmental factors like diet or exposure to hyperglycemia/hyperlipemia are contributed to etiology of diabetes mellitus and its micro- and macrovascular complications. These complications are the main reason of mortality burden of diabetes mellitus. The results of large, prospective clinical trials (DCCT-EDIC, UKPDS) suggest that diabetic complications attributable to poorly controlled glycemia before diabetes recognition can manifest long after glycemia normalization during antidiabetic therapy. It is believed that cause of this effect is so called „metabolic memory” or the legacy effect. The first communication about metabolic memory was reported over 20 years ago. Studies concerning etiology and mechanism of this phenomenon are still in progress. Interestingly, transient exposure to hyperglycemia causes persist epigenetic modifications that lead to changes in chromatin and gene expression, which mediate metabolic dysfunctions in diabetes mellitus.

Key words: hyperglycemia, metabolic memory, histon methylation, vascular diabetes complications

Wstęp

W cukrzycy (zarówno typu 1, jak i typu 2) dochodzi do uszkodzenia, zaburzenia czynności, a w końcu do niewydolności różnych narządów,

szczególnie oczu, nerek, nerwów, serca i naczyń krwionośnych. Najczęstszą przyczyną śmiertelności chorych na cukrzycę są powikłania przewlekłe związane z makroangiopatią. Miażdżycza

u tych pacjentów różni się w znacznym stopniu, zarówno pod względem klinicznym, jak i morfologicznym, od miażdżycy u chorych z prawidłową tolerancją węglowodanów. Za jedną z przyczyn tego zjawiska uważana jest hiperglikemia, a raczej dysglikemia (znaczące wahania stężenia glukozy), która toksycznie wpływa na komórki śródbłonna naczyń [1]. Szczególne znaczenie przypisuje się hiperglikemii poposiłkowej, która znacznie wyprzedza w rozwoju cukrzycy pojawienie się hiperglikemii na czczo (nawet o kilka lat przed jej rozpoznaniem). Stąd można wywnioskować, że powikłania naczyniowe cukrzycy mają początek bardzo wcześnie – w tzw. okresie przedklinicznym (bezobjawowym) choroby. Duży procent chorych w chwili rozpoznania cukrzycy ma już objawy powikłań sercowo-naczyniowych (m.in. ostry zespół wieńcowy, a nawet przebyte udar mózgu). Powikłania związane z mikroangiopatią u chorych na cukrzycę objawiają się nefro-, neuro- i retinopatią, które również wpływają na skrócenie średniego czasu życia tej grupy pacjentów. Należy pamiętać, że niewyrównana gospodarka węglowodanowa nie jest jedynym czynnikiem ryzyka rozwoju powikłań cukrzycy. Bardzo istotne są również dyslipidemia [2], nadciśnienie [3] czy uwarunkowania genetyczne [4]. Jednak hiperglikemia jest kluczowym czynnikiem uszkodzenia śródbłonna naczyń, przebiegającym za pośrednictwem kilku mechanizmów metabolicznych i hemodynamicznych.

Głównymi szlakami rozwoju zaburzeń naczyniowych w warunkach hiperglikemii są szlaki polioliowy i heksozoaminy, powstawanie wewnątrzkomórkowych, „trudno odwracalnych” produktów glikacji (AGE) i m.in. aktywacja kinazy białkowej C. Procesy te powodują zwrotne działanie produkowanych w nadmiarze rodników tlenowych w mitochondrialnym łańcuchu transportującym elektrony. Wolne rodniki generowane w mitochondriach obciążonych nadmiarem substratów energetycznych (glukoza, wolne kwasy tłuszczowe) w różnym stopniu przyczyniają się do powstawania mutacji w mitochondrialnym DNA (mtDNA), jak i modyfikacji białek komórki [5]. Brak histonów ochraniających mtDNA oraz mniej wykształcone procesy naprawcze w mitochondrialnym niż w jądrowym DNA powodują, że powstające mutacje prowadzą do trwałego uszkodzenia komórek i szybkiego postępu degeneracji tkanek. Przemiany te wzmacniają odpowiedź wewnątrzkomórkową na warunki hiperglikemii. Między innymi dochodzi do zwiększonej produkcji czynników nasilających proliferację komórek ściany naczyń – naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), transformującego czynnika wzrostu β (*transforming growth factor β* , TGF- β), insulino-

podobnego czynnika wzrostu 1 (*insulin-like growth factor 1*, IGF-1) i indukcji prozakrzepowego czynnika tkankowego (TF). Poza tym procesy te zwiększają obszar odczynu immunologiczno-zapalnego, aktywując szlaki kontrolowane przez NF κ B, oraz proces zapalny w ścianach naczyń, zwłaszcza naczyń drobnych [5].

Hiperglikemia bierze udział również w regulacji systemu renina-angiotensyna oraz zmian w generowaniu i dostępności tkankowej śródbłonnego tlenu azotu, przez co aktywuje skurcz naczyń i przyczynia się do rozwoju nadciśnienia tętniczego i gotowości prozakrzepowej [6].

Do tej pory przeprowadzono kilka istotnych dla wiedzy klinicznej badań na grupach osób leczonych z powodu cukrzycy typu 1 i typu 2, w celu sprawdzenia wpływu niewyrównania gospodarki węglowodanowej na rozwój powikłań naczyniowych – DCCT, UKPDS [7, 8]. Wymienione badania potwierdziły ten wpływ i pokazały, że powikłania naczyniowe mogą pojawić się już po wyrównaniu gospodarki węglowodanowej, długo po epizodach hiperglikemii. Efekt ten tłumaczono tzw. efektem „pamięci metabolicznej” albo „efektem dziedziczenia” [9]. To znaczy, że nawet krótkotrwałe, przemijające, ale powtarzające się stany hiperglikemii mogą zainicjować rozwój stałych zmian w aktywności genów związanych z rozwojem cukrzycy, bez zmiany ich struktury – sekwencji samego łańcucha DNA. Chodzi tu o tzw. wpływ epigenetyczny hiperglikemii (np. metylację, acetylację, czyli wprowadzenie nowych grup chemicznych do istniejącego materiału jądrowego). Ten efekt dotyczy także zmian w strukturze chromatyny – białka strukturalnego jądra. Oba te zjawiska wywołują zmiany w ekspresji genów i są przyczyną tzw. „pamięci metabolicznej” tworzących w konsekwencji jeszcze jeden mechanizm rozwoju naczyniowych powikłań cukrzycy. Wyniki tych badań podkreślają znaczenie wczesnego wyrównania gospodarki węglowodanowej w prewencji cukrzycy i jej powikłań [7–11].

Obecne badania kliniczne i epidemiologiczne wskazują na złożoną etiologię rozwoju cukrzycy, opartą na interakcjach gen-środowisko (opartych na zmianach epigenetycznych, które – jak udowodniono – w sposób istotny regulują ekspresję genów [10]). Wykazały one również, że przejściowa hiperglikemia w przeszłości może wyindukować w ludzkich komórkach, także śródbłonna, stałe, epigenetyczne zmiany, które aktywują ekspresję genów pomimo właściwej kontroli choroby i utrzymywania docelowych parametrów wyrównania cukrzycy nawet we wczesnym objawowym okresie [11]. W ciągu ostatnich kilku lat prowadzone były badania na hodowlach komór-

kowych i modelach zwierzęcych, mające na celu lepsze zrozumienie związków procesów epigenetycznych związanych z hiperglikemią i w konsekwencji – rozwojem objawów powikłań cukrzycy [11–15].

Modele zwierzęce

Badania na szczurach z doświadczalną cukrzycą wykazały, że początkowo niepełna kontrola glikemii powodowała oksydacyjny i wywołany nadprodukcją tlenu azotu (nitrozyłacja białek) stres, spowodowany przez zwiększoną ekspresję indukowalnej syntazy tlenu azotu *Nos2* [12]. Późniejsze wyrównanie glikemii nie hamowało postępu rozwoju retinopatii u tych zwierząt. Przeszczep wysepek trzustkowych u szczurów w 6 tygodni po rozwinięciu cukrzycy spowolnił rozwój retinopatii cukrzycowej i zapobiegał okluzji naczyń siatkówki. Natomiast ten sam zabieg u szczurów, ale już po 12 tygodniach objawowej cukrzycy tylko częściowo spowolnił rozwój retinopatii, ale już nie zapobiegał zamknięciu naczyń. Wyniki tych badań przemawiają za tym, że zmiany wywołane wczesną hiperglikemią są nieodwracalne, a korzyści z uzyskania normoglikemii w trakcie leczenia cukrzycy są możliwe i największe po jak najszybszej normalizacji glikemii od momentu rozpoznania wczesnych, przemijających zaburzeń poziomu glikemii [13].

Modele hodowli komórkowej

Pierwsze badania nad ludzkimi komórkami śródbłonka służyły do demonstrowania zjawiska przetrwałej zmiany ekspresji genu w odpowiedzi na okresową, przemijającą hiperglikemię [14]. W tym badaniu wykazano wzrost ekspresji genów fibronektyny i kolagenu IV w warunkach znacznej hiperglikemii (50 mmol/l) przez kilka godzin. Aktywacja tej ekspresji pozostawała nadal wysoka, mimo że komórki były hodowane przez następne kilkanaście dni w warunkach normoglikemii.

Wykazano, że w tych komórkach w warunkach hiperglikemii wzrasta stężenie markerów stresu oksydacyjnego, takich jak aktywność kinazy białkowej C (PKC β) czy ekspresja podjednostki NADPH-oksydazy (p47phox). Blokowanie nadtlenu, farmakologicznie lub przez zwiększenie ekspresji genu rozprzegającego łańcuch mitochondrialny (*uncoupling protein 2*, UCP2), zmniejszało wywołaną hiperglikemią nadprodukcję nadtlenu i normalizowało ekspresję PKC β i p47phox [15]. Wyniki tych badań sugerują, że konsekwencje oksydacyjnego stresu komórkowego związanego z mitochondrialną nadprodukcją wolnych rodników, zaktywowaną przez hiperglikemię przetrwały mimo powrotu do normoglikemii [15].

Kod epigenetyczny

Epigenetyka to nauka o dziedziczności pozagenowej, czyli o zmianach ekspresji genów niezwiązanych z informacjami zawartymi w sekwencji DNA.

Epigenetyczna kontrola transkrypcji genów opiera się na dwóch głównych procesach. Pierwszy z nich to odwracalna metylacja DNA, głównie cytozyny w pozycji C5 (rzadziej w pozycji N3) czy metylacji adeniny w pozycji C6. Drugi proces polega na zmianie struktury i funkcji chromatyny przez chemiczną modyfikację histonów – głównie metylację, acetylację, fosforylację i in. aminokwasów histonowych [16]. Metylacja DNA i modyfikacja histonów są integralnymi procesami i tworzą dodatkowy, specyficzny, ulegający modyfikacji zależnej też od zmian w środowisku kod epigenetyczny.

Zmiany epigenetyczne materiału jądrowego w komórce odpowiadają za wiele ważnych zmian w jej funkcji. Przede wszystkim dezaktywują liczne sekwencje powtórzone, odpowiadają za piętnowanie rodzicielskie, wyłączenie drugiego chromosomu X w komórkach żeńskich, kontrolują procesy rozwoju i podziału komórek, czyli dojrzewanie i remodeling tkanek.

Modyfikacja histonu H3

Metylacja histonowej argininy i lizyny wiąże się z aktywacją lub represją transkrypcji i może odgrywać rolę markera przetrwałych zmian epigenetycznych. Gdy metylacja histonowej argininy powoduje przede wszystkim aktywację transkrypcji, to metylacja lizyny może spowodować zarówno aktywację, jak i represję transkrypcji. Metylacja konkretnych lizyn w histonie H3 (H3 Lys4, H3 Lys36, H3 Lys79) związana jest z aktywacją ekspresji genów [17]. Natomiast metylacja H3 Lys27 czy H3 Lys20 ogólnie koreluje z supresją aktywności genu [17].

Metylacja histonowych: lizyny i argininy zachodzi pod wpływem metylotransferaz, odpowiednio lizynowej i argininowej. Enzymy te należą do trzech rodzin białek – rodziny białkowej metylotransferazy argininy, zawierającej domenę SET, białkowej rodziny metylotransferazy lizyny i niezawierającej domeny SET DOT-1 podobnych białek [18]. Większość metylotransferaz lizyny zawierających domenę SET zostaje włączona w proces epigenetyczny, zwykle modyfikując konkretną lizynę na konkretnym histonie. SET7, odkryta niezależnie przez dwie grupy badawcze [19, 20], jest związana z rozwojem zależnej od hiperglikemii modyfikacji transkrypcji. Kilka badań wskazuje, że aktywność SET7 metylotransferazy w histonie H3 Lys4 jest induktorem epigenetycznych zmian powodujących przewlekłą aktywację genów pod

wpływem hiperglikemii w komórkach śródbłonna, monocytach i komórkach β trzustki [11, 21, 22]. U myszy pozbawionych SET7 w komórkach β trzustki dochodzi do supresji genów zależnej od glukozy sekrecji insuliny, np. *Ins 1*, *Ins 2* czy *Slc2a2*, poprzez utratę zmian w metylacji H3 Lys-4m2 [22], który wskazuje, że funkcja SET7 w komórkach β jest niezbędna do właściwej produkcji i wydzielania insuliny. SET7 metylotransferaza lizyny aktywuje transkrypcję w warunkach hiperglikemii przez metylację Lys4 w H3 u pacjentów z cukrzycą. Enzym ten może więc stać się nowym celem terapeutycznym w łagodzeniu wywołanych hiperglikemią powikłań cukrzycy [21–23].

Natomiast aktywność innego enzymu histonowej H3-metylotransferazy lizyny (SUV39H1), chroni przed nadmierną aktywacją ekspresji genów prozapalnych poprzez metylację H3 Lys9 w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń u osób z cukrzycą [23].

Poza metylacją przez SET7 histonowa metylotransferaza argininy – CARM1 – może aktywować mediowaną przez NF κ B ekspresję genów odczynu immunologiczno-zapalnego czy apoptozy – przez metylację H3 Arg17 w monocytach [24].

Odkryto i opisano również demetylazę, która odszczepia grupy metylowe w histonach. Jako pierwszą opisano histonową, specyficzną dla lizyny demetylazę 1A (LSD1A). Demetyluje ona H3 Lys4, jak również H3 Lys9, co może, zależnie od rodzaju genu, albo aktywować, albo powodować supresję transkrypcji [25].

Wyżej wymienione badania potwierdzają istotny udział metylotransferaz SET7, SUV39H1 i CARM1 w regulacji ekspresji genów wywołanej nawet przejściową hiperglikemią.

Zmiany epigenetyczne w modelach pamięci metabolicznej

Wspomniane w tym artykule badania kliniczne sugerują zależność między krótkotrwałymi, przemijającymi stanami hiperglikemii, a rozwojem cukrzycowych powikłań naczyniowych, występujących nawet 30 lat później, po okresie niewyrównanej hiperglikemii (wyniki badania DCCT rozszerzone o wyniki pacjentów tej grupy badanych po 30 latach – EDIC [26]). Obecnie kilka zespołów badawczych pracuje nad wyjaśnieniem przyczyny i mechanizmu powstawania tego zjawiska. Przedmiotem ich pracy jest m.in. identyfikacja potencjalnych „ścieżek” aktywacji grup genów indukowanych przez hiperglikemię.

Wiadomo, że wczesnym markerem rozwoju cukrzycy, jeszcze przed pojawieniem się klinicznych objawów tej choroby, jest rozwój „stanu zapalnego”, z produkcją różnych cytokin prozapalnych, np. TNF α w insulinoopornych adi-

pocytach (cukrzyca typu 2), czy uszkodzenie komórek śródbłonna w warunkach hiperglikemii (cukrzyca typu 1). W kilku badaniach zwrócono uwagę na indukowaną hiperglikemią aktywację prozapalnych genów związanych z czynnikiem transkrypcyjnym NF κ B [11]. W monocytach glukoza aktywuje NF κ B, dochodzi do hiperacetytacji histonów H3 i H4 i transkrypcyjnej aktywacji genów prozapalnych TNF α i indukowalnej cyklo-oksigenazy COX2. Co więcej, w genomie wykryto dwa regiony predysponujące do rozwoju cukrzycy – 6q21 oraz 19q13, w których zakodowane są geny histonowej deacetylazy (HDAC) – HDAC2, oraz tzw. „gen długowieczności” – SIRT2 [27, 28]. Możliwe, że te obserwacje posłużą w przyszłości do prób znalezienia leków powodujących modulację aktywności HDAC w leczeniu cukrzycy.

Doniesienia z ostatnich kilku lat wskazują, że również zmienność poziomu glikemii może prowadzić do zmian epigenetycznych, szczególnie metylacji histonów. Metylacja histonu H3 w miejscach Lys4 i Lys9 w monocytach modyfikowała ekspresję genów białek związanych z przekaźnictwem sygnału receptora insuliny, stanem zapalnym, jak i z mechanizmami stresu oksydacyjnego. Dodatkowo potwierdzono, że metylacja argininy w H3 (H3 Arg17) jest związana z aktywacją NB κ B-zależnych genów [24]. Hamująca transkrypcję metylacja H3 Arg9 była znacznie obniżona na genach promujących zapalenie w komórkach mięśniówki gładkiej naczyń w cukrzycy [23]. Wyniki tych badań wskazują na aktywację przez glukozę zmian epigenetycznych w genie *RELA* oraz w komórkach śródbłonna [11].

Chociaż samo zjawisko zmian epigenetycznych wpływających na ekspresję genów jest coraz lepiej poznawane, lokalizacja poszczególnych determinant, które wpływają na rodzaj genów o zmienionej ekspresji, jak i trwałość tych zmian wciąż nie są znane. Dalsze badania nad epigenetycznymi modyfikacjami genomu i nad potranslacyjnymi zmianami białek, w tym histonów, pomogą zdefiniować przekaźnictwo śródkomórkowe mechanizmów modyfikacji odpowiedzi komórki indukowanej przez hiperglikemię.

Podsumowanie

Przewlekłe powikłania cukrzycy typu 1 i typu 2, będące najważniejszą przyczyną śmiertelności z powodu tej choroby, mają podłoże głównie mikro- i makronaczyniowe. Istotnym, choć nie jedynym czynnikiem ryzyka wystąpienia naczyniowych powikłań cukrzycy jest, nawet przejściowo, na początku choroby, zaburzony poziom glikemii. Wyniki dużych prospektywnych badań klinicznych (DCCT-EDIC, UKPDS) sugerują, że przyczyny powikłań przypisywane źle wyrównanej gospodar-

ce węglowodanowej w trakcie choroby mogą występować na samym początku niediagnozowanych okresów przejściowej hiperglikemii, gdy objawy (np. naczyniowe) – długo po normalizacji glikemii u chorych na cukrzycę. Badania na hodowlach komórkowych i modelach zwierzęcych ujawniły, że przetrwała kliniczna i biologiczna odpowiedź na ekspozycję na hiperglikemię pozostaje mimo powrotu do warunków normoglikemii. U pacjentów przejściowa, początkowa hiperglikemia indukuje trwałe, epigenetyczne modyfikacje DNA i histonów, co przyczynia się do stałej zmiany ekspresji genów odczynu immunologiczno-zapalnego

i powstania powikłań mimo normalizacji glikemii, drogą tzw. „pamięci metabolicznej” o wyżej opisanym mechanizmie epigenetycznych modyfikacji.

Adres do korespondencji:

Ilek. Małgorzata Kieć-Klimczak
Katedra Biochemii Klinicznej Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego
31-501 Kraków, ul. Kopernika 15a
tel.: (12) 424-87-92
e-mail: mkieck@mp.pl

Piśmiennictwo:

1. Sheetz M.J., King G.L.: Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 2002, 288: 2579-2588.
2. Nesto R.: Beyond low-density lipoprotein: addressing the atherogenic lipid triad in type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Am. J. Cardiovasc. Drugs* 2005, 5: 379-387.
3. Mourad J.J., Le Jeune S.: Blood pressure control, risk factors and cardiovascular prognosis in patients with diabetes: 30 years of progress. *J. Hypertens.* 2008, 26 (Suppl. 3): S7-S13.
4. McCarthy M.I., Froguel P.: Genetic approaches to the molecular understanding of type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002, 283: E217-E225.
5. Brownlee M.: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001, 414: 813-820.
6. Forbes J.M., Fukami K., Cooper M.E.: Diabetic nephropathy: where hemodynamics meets metabolism. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 2007, 115: 69-84.
7. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N. Eng. J. Med.* 1993, 329: 977-987.
8. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). VIII. Study design, progress and performance. *Diabetologia* 1991, 34: 877-890.
9. Chalmers J., Cooper M.E.: UKPDS and the legacy effect. *N. Engl. J. Med.* 2008, 359: 1618-1620.
10. Ling C., Groop L.: Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes* 2009, 58: 2718-2725.
11. El-Osta A., Brasacchio D., Yao D. et al.: Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J. Exp. Med.* 2008, 205: 2409-2417.
12. Kowluru R.A.: Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes* 2003, 52: 818-823.
13. Hammes H.P., Klinzing I., Wiegand S. et al.: Islet transplantation inhibits diabetic retinopathy in the sucrose-fed diabetic Cohen rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993, 34: 2092-2096.
14. Roy S., Sala R., Cagliero E., Lorenzi M.: Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: phenomenon with a memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87: 404-408.
15. Ilnat M.A., Thorpe J.E., Kamad C.D. et al.: Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signaling. *Diabetologia* 2007, 50: 1523-1531.
16. Ruthenburg A.J., Allis C.D., Wysocka J.: Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol. Cell.* 2007, 25: 15-30.
17. Turner B.M.: Cellular memory and the histone code. *Cell* 2002, 111: 285-291.
18. Feng Q., Wang H., Ng H.H. et al.: Methylation of H3 lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr. Biol.* 2002, 12: 1052-1058.
19. Wang H., Cao R., Xia L. et al.: Purification and functional characterization of histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol. Cell.* 2001, 8: 1207-1217.
20. Nishioka K., Chuikov S., Sarma K. et al.: Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev.* 2002, 16: 474-489.
21. Li Y., Reddy M.A., Miao F. et al.: Role of the histone H3 lysine 4 methyltransferase, SET 7/9, in the regulation of NF- κ B – dependent inflammatory genes. Relevance to diabetes and inflammation. *J. Biol. Chem.* 2008, 283: 26771-26781.
22. Deering T.G., Ogihara T., Trace A.P. et al.: Methyltransferase SET7/9 maintains transcription and euchromatin structure at islet-enriched genes. *Diabetes* 2009, 58: 185-193.
23. Villeneuve L.M., Reddy M.A., Lanting L.L. et al.: Epigenetic histone H3 lysine 9 methylation in metabolic memory and inflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105: 9047-9052.
24. Miao F., Li S., Chavez V. et al.: Coactivator-associated arginine-methyltransferase-1 enhances nuclear factor- κ B-mediated gene transcription through methylation of histone H3 at arginine 17. *Mol. Endocrinol.* 2006, 20: 1562-1573.
25. Wang J., Hevi S., Kurash J.K. et al.: The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat. Genet.* 2009, 41: 1271-1278.
26. Nathan D.M., Zinman B., Cleary P.A. et al.: Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983–2005). *Arch. Intern. Med.* 2009, 169: 1307-1316.
27. Xiang K., Wang Y., Zheng T. et al.: Genome-wide search for type 2 diabetes/impairment glucose homeostasis susceptibility genes in the Chinese: significant linkage to chromosome 6q21-q23 and chromosome 1q21-q24. *Diabetes* 2004, 53: 228-234.
28. van Tilburg J.H., Sandkuijl L.A., Franke L. et al.: A genome-wide scan in type 2 diabetes mellitus provides independent replication of a susceptibility locus on 18p11 and suggests the existence of novel loci on 2q12 and 19q13. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003, 88: 2223-2230.

Regulamin zamieszczania prac

Zasady przyjmowania i publikacji prac do kwartalnika „Czynniki Ryzyka”

Kwartalnik „Czynniki Ryzyka” jest czasopismem indeksowanym w INDEX COPERNICUS. „Czynniki Ryzyka” zamieszczają prace poglądowe, oryginalne, kazuistyczne i inne dotyczące szeroko rozumianej problematyki patogenezы miazdżycy, jej leczenia, epidemiologii, profilaktyki, roli żywienia, itp.

Prawa autorskie

Przyjmując pracę do druku wydawca nabywa na zasadzie wyłączności prawa autorskie do wydrukowanych prac (w tym prawo do wydawania drukiem, na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Dopuszcza się jedynie drukowanie streszczeń bez zgody wydawcy. Autorzy mogą otrzymać 5 egzemplarzy kwartalnika.

Format prac

- Prace powinny być nadesłane na adres redakcji na CD-romie w formacie Word for Windows lub w wersji elektronicznej na adres mailowy: kornelch@sci.pam.szczecin.pl, przy zachowaniu następujących zasad wielkość czcionki 12 punktów, odstępy między wierszami 1,5 linii, margines lewy 2 cm, margines prawy 3 cm.
- Do pracy należy dołączyć zgodę wszystkich autorów na publikację. Zgoda na publikację jest jednoznaczna z oświadczeniem autorów, że praca nie była publikowana w całości w innym czasopiśmie medycznym (innym, polskim czasopiśmie medycznym). Do maszynopisu należy dołączyć oświadczenie podpisane przez wszystkich autorów stwierdzające, że brali udział w przygotowaniu pracy i biorą odpowiedzialność za jej treść. Zgodę autorów oraz oświadczenie można przesłać również w wersji elektronicznej na adres mailowy: maria.liedke@mededu.pl
- Tekst pracy oryginalnej powinien składać się z następujących części: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, omówienie, wnioski, piśmiennictwo, opisy rycin i ryciny. Przy stosowaniu skrótów konieczne jest podanie pełnego brzmienia przy pierwszym użyciu. Wszystkie skróty muszą być wyjaśnione w artykule przy ich pierwszym użyciu, a także dodatkowo w każdym opisie wszystkich tabel i rycin i w obydwu wersjach językowych streszczenia.
- Na pierwszej stronie pracy należy podać: pełne imię i nazwisko autora (autorów), stopień, tytuł naukowy autora (autorów), tytuł pracy (polski i angielski), pełną nazwę ośrodka (ośrodków) z którego praca pochodzi, stopień, tytuł naukowy oraz imię i nazwisko kierownika ośrodka. Na dole strony należy umieścić adres, na jaki autor życzy sobie otrzymywać korespondencję wraz z tytułem naukowym, pełnym imieniem i nazwiskiem, oraz numerem telefonu (prosimy o zaznaczenie, czy autor wyraża zgodę na publikację numeru telefonu) i adresem poczty elektronicznej.
- Do pracy należy dołączyć streszczenie zarówno w języku polskim, jak i angielskim. Streszczenie prac oryginalnych powinno zawierać ok. 150-250 słów i składać się z następujących elementów: Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Wnioski. W streszczeniu nie należy stosować skrótów.
- Po streszczeniu należy podać słowa kluczowe (3-5) w języku polskim i angielskim.

Piśmiennictwo

- Piśmiennictwo powinno być ułożone według kolejności cytowania w pracy.
- Przy opisach artykułów z czasopism należy podać: nazwisko autora, pierwszą literę imienia (przy większej niż 4 liczbie autorów podaje się tylko pierwszych trzech i adnotacje „et al.” w pracach w języku angielskim oraz „i wsp.” w pracach w języku polskim), tytuł pracy, skrót tytułu czasopisma, rok wydania, numer tomu (rocznika), numery stron, na których zaczyna się i kończy artykuł. Należy zachować zapis i interpunkcję ściśle według poniższego przykładu: *Kowalski J.: Fibrates in treatment of CHD. Czynniki Ryzyka, 1992; 70:733-737*
- Przy opisach książek należy podać: nazwisko autora, pierwszą literę imienia, tytuł, oznaczenie kolejności wydania, wydawnictwo, miejsce i rok wydania, numery stron; przy pracach zbiorowych nazwisko redaktora odpowiedzialnego podaje się po tytule książki i skrócie „red.”. Należy zachować zapis i interpunkcję ściśle według poniższego przykładu: *Kowalski J. Zasady Publikacji prac naukowych Zespół Metaboliczny 33 pytania. Emka Media Group, Warszawa 2003; 354-366*

Zdjęcia, grafiki

- Zdjęcia i grafiki powinny być nadesłane na adres redakcji na CD-romie lub DVD-romie w jednym z podanych formatów: *.jpg *.eps, *.bmp, *.gif, *.tif, *.cdr, *.ai.
- Materiały skanowane powinny posiadać rzeczywisty rozmiar jaki ma być użyty w publikacji oraz rozdzielczość 300 dpi.
- Wszystkie dostarczone materiały powinny być dokładnie opisane.

Uwagi

- Nadesłane prace są kierowane do niezależnych recenzentów w celu zakwalifikowania do druku.
- Redakcja zastrzega sobie prawo opatrzenia publikowanych prac komentarzem redakcyjnym oraz do redagowania tekstów. Prace przygotowane niezgodnie z zasadami zostaną zwrócone autorom do poprawienia.
- Redakcja nie odpowiada za treść zamieszczanych reklam.
- Redakcja nie zwraca materiałów nie zamówionych.

XIV NAUKOWY ZJAZD

Polskiego Towarzystwa Badań nad Miażdżycą

20–23 października 2011 r., Krąg k. Koszalina

Organizator:

prof. dr hab. Marek Naruszewicz
prof. dr hab. med. Tomasz Guzik

Sekretariat:

dr n. med. Grzegorz Osmenda
dr n. med. Władysław Kosiniak-Kamysz

Tematy wiodące:

- Molekularne podstawy miażdżycy i jej biomarkery
 - Ryzyko rezydualne miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca
 - Miażdżycy a nadciśnienie tętnicze – od związków hemodynamicznych do immunologicznych
 - Varia
- sesje plenarne w języku polskim

The Eight – – Atherothrombosis Conference

- prezentacja najnowszych osiągnięć wiodących ośrodków polskich i światowych w zakresie miażdżycy
– sesja w języku angielskim

Warunki uczestnictwa na odwrocie.

Zgłoszenie uczestnictwa

w XIV Zjeździe Polskiego Towarzystwa Badań nad Miażdżycą

Imię i nazwisko

Tytuł/stopień naukowy

Miejsce pracy (ośrodek)

Adres do korespondencji:

Tel./faks: e-mail:

Zgłaszam doniesienie (wstępny tytuł)

.....
(miejscowość, data)

Forma uczestnictwa:

czynna

bierna

(zaznaczyć właściwe)

.....
(podpis)

Warunki uczestnictwa w Zjeździe

Zgłoszenia na Zjazd prosimy przysłać do 31 sierpnia 2011 r. na adres:

dr n. med. Władysław Kosiniak-Kamysz
Katedra Chorób Wewnętrznych i Medycyny Wsi
Szpital Specjalistyczny im. J. Dietla w Krakowie
ul. Skarbowa 1, 31-121 Kraków

Sekretariat Zjazdu:

tel.: (12) 633 00 03, (12) 687 62 10, tel./faks: (12) 631 04 40,
e-mail: osmendag@wp.pl

Rejestracja elektroniczna:

www.ptbnm.pl

Streszczenia nieprzekraczające 250 słów prosimy przysłać na e-mail: osmendag@wp.pl

– tel.: (12) 631 04 40.

Przyjmowanie streszczeń do 31 sierpnia 2011 r. Powinny one zawierać następujące informacje:

- tytuł pracy,
- nazwiska autorów (z podkreśleniem nazwiska i imienia osoby prezentującej pracę),
- nazwę i adres ośrodka naukowego (także telefon i adres e-mailowy),
- główny tekst (cel pracy, krótka metodyka badań, wyniki i wnioski).

Oplaty za uczestnictwo prosimy przysłać do 31 sierpnia 2011 r.

Numer konta, na który należy przysłać opłaty za uczestnictwo w zjeździe:

Polskie Towarzystwo badań nad Miażdżycą PKP II O/Szczecin 94 1020 4795 0000 9602 0080 1381.

– dla członków PTBnM (opłacona składka członkowska za rok 2011) – 700,00 zł

– dla pozostałych uczestników – 750,00 zł

Opłata za uczestnictwo zawiera koszt pobytu 1 osoby: 3 x nocleg, śniadanie, obiad, kolacja.

Zakwaterowanie wyłącznie w hotelu Podewils w Krągu – liczba miejsc ograniczona, nie przewidujemy w związku z tym obecności osób towarzyszących.

Przypominamy członkom PTBnM, że podczas zjazdu odbędzie się zebranie Zarządu.

**Katedra Chorób Wewnętrznych i Medycyny
Wsi Uniwersytetu Jagiellońskiego**



Polskie Towarzystwo Badań nad Miażdżycą

**ul. Skarbowa 1
31-121 Kraków**

ZGŁOSZENIE

dnia

Uprzejmie proszę o przyjęcie mnie w poczet członków
POLSKIEGO TOWARZYSTWA BADAŃ NAD MIAŻDŻYCĄ

.....
(podpis zgłaszającego)

1. Imię i nazwisko
2. Tytuł/stopień naukowy
3. Rodzaj ukończonych studiów (uczelnia, wydział, rok ukończenia)
4. Stanowiska i miejsce pracy (kod, adres, telefon, e-mail)
5. Kierunek pracy badawczej:
6. Adres prywatny (kod pocztowy), telefon
- e-mail

W krótkich prosimy zaznaczyć adres do korespondencji. Członkostwo PTBnM gwarantuje bezpłatne otrzymywanie kolejnych egzemplarzy „Czynników Ryzyka”

Przyjęto w poczet członków
Polskiego Towarzystwa Badań nad Miażdżycą w dniu

.....
(Przewodniczący)

.....
(Sekretarz)

Składka członkowska za rok 2010 wynosi 40 zł
Nasze konto: Polskie Towarzystwo Badań nad Miażdżycą PKO II O/Szczecin 94 1020 4795 0000 9602 0080 1381

Czynniki Ryzyka

PISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA BADAŃ NAD MIAŻDŻYCĄ

ZAMÓW PRENUMERATĘ W ATRAKCYJNEJ CENIE! 39 zł za 4 numery

Prenumeratorzy chcący otrzymać fakturę VAT proszeni są o przekazanie pełnych danych (nazwa, adres, NIP) faksem pod numer: (22) 862-36-63 wew. 30 lub e-mailem: marcin.szpak@mededu.pl
W przypadku, gdyby adres dostawy był inny od adresu wpłacającego, prosimy o informację.

Wytnij kupon, wypełnij go i opłać prenumeratę na poczcie lub w banku

Medical Education Sp. z o.o., ul. Opaczewska 60D, 02-201 W-wa	M E D I C A L E D U C A T I O N S P. Z O. O.
70 1090 1753 0000 0001 0252 7639	U L . O P A C Z E W S K A 6 0 D , 0 2 - 2 0 1 W A R S Z A W A
39,00 zł	7 0 1 0 9 0 1 7 5 3 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 2 5 2 7 6 3 9
imię, nazwisko i adres wpłacającego	W P * P L N 3 9 , 0 0
tytułem	TRZYDZIEŚCI DZIEWIĘĆ ZŁOTYCH ZERO GROSZY
Prenumerata - Czynniki Ryzyka od nr:	nazwa zleceniodawcy
..... do nr	nazwa zleceniodawcy cd.
ODCINEK DLA ODBIORCY	tytułem
opłata - podpis	P R E N U M E R A T A
stempel	tytułem cd.
	C Z Y N N I K I R Y Z Y K A
	data - pieczęć - podpis zleceniodawcy
	opłata - podpis
	stempel

* P - polecenie przelewu
W - wpłata gotówkowa

