

Nrf2 jako terapeutyczny punkt uchwytu w profilaktyce i terapii chorób cywilizacyjnych

Nrf2 as therapeutic target in prevention and therapy of civilization diseases

Marta Cykowiak, Violetta Krajka-Kuźniak

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

Streszczenie

Nrf2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) stanowi jeden z kluczowych czynników transkrypcyjnych w organizmie ludzkim. Do chwili obecnej zostało zidentyfikowanych ponad 250 genów docelowych dla Nrf2. Geny te zaangażowane są w wiele procesów komórkowych, m.in. regulację procesów redukcji-oksydacyjnych, metabolizm ksenobiotyków, naprawę DNA, zapewnienie homeostazy na poziomie białek, metabolizm węglowodanów oraz lipidów, a także procesy związane z utrzymaniem prawidłowego poziomu żelaza. Aktywacja Nrf2 wywoływana jest przez czynniki prooksydacyjne, głównie RFT (reaktywne formy tlenu), jak również związki o właściwościach elektrofilowych, które stanowią najczęściej metabolity chemicznych kancerogenów. Ze względu na bezsprzeczne powiązanie ścieżki sygnalizacyjnej Nrf2 ze stresem oksydacyjnym, jest ona szczególnie interesującym punktem uchwytu dla leków stosowanych w schorzeniach, mających związek z szeroko rozumianym stresem oksydacyjnym, m.in. w nowotworach, cukrzycy, chorobach układu sercowo-naczyniowego, a także schorzeniach neurodegeneracyjnych oraz przewlekłej chorobie nerek i wątroby. (*Farm Współ 2019; 12: 42-49*)

Słowa kluczowe: Nrf2, stres oksydacyjny, chemoprewencja, nowotwór, choroby cywilizacyjne

Summary

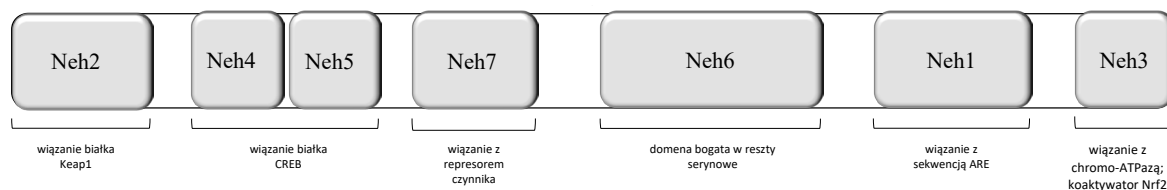
Nrf2 (nuclear factor 2-related factor 2) is one of the key transcription factors in the human body. To date, over 250 target genes have been identified for Nrf2. These genes are involved in many cellular processes, including regulation of reduction-oxidation processes, metabolism of xenobiotics, repair of DNA, ensuring homeostasis at the protein level, metabolism of carbohydrates and lipids, as well as processes related to maintaining the correct level of iron. Nrf2 activation is the effect of prooxidative factors, mainly ROS (reactive oxygen species), as well as compounds with electrophilic properties, which are the most common metabolites of chemical carcinogens. Due to the unquestionable connection of the Nrf2 signaling pathway with oxidative stress, it is a particularly interesting point in the grip for drugs used in medical conditions related to broadly understood oxidative stress, among others cancers, diabetes, cardiovascular diseases, as well as neurodegenerative disorders and chronic kidney and liver disease. (*Farm Współ 2019; 12: 42-49*)

Key words: Nrf2, oxidative stress, chemoprevention, cancer, civilization diseases

Nrf2 – struktura oraz mechanizm działania

Nrf2 jest białkiem, zbudowanym z 589 aminokwasów zaliczanych do rodziny Cap'n'collar (CNC), zawierającym w swojej budowie trójwymiarową strukturę zamka leucynowego (ang. *basic leucine zipper; bZip*), która dzięki obecności α helis bogatych w reszty leucyny, umożliwia wiązanie z jądrowym DNA [1].

Strukturę białka Nrf2 tworzy siedem konserwatywnych domen, które oznaczono Neh1-Neh7 (rycina 1). N-końcowa domena – Neh2 odpowiedzialna jest za przyłączenie do Nrf2 swoistego inhibitora – białka Keap1 (ang. *Kelch-like ECH-associated protein 1*), dlatego też nazywana jest mianem negatywnego regulatora. Domeny Neh4 oraz Neh5, które stanowią regiony kwasowe, pozwalają na wiązanie z białkiem CREB



Rycina 1. Struktura białka Nrf2
Figure 1. Structure of Nrf2 protein

(białko odpowiedzi na podwyższone stężenia cAMP), jak również wzmagają aktywność transkrypcyjną Nrf2. Obszar Neh7, będący najpóźniej odkrytym obszarem, odpowiada prawdopodobnie za wiązanie z represorem czynnika. Domena Neh6, bogata w reszty seryny, oraz Neh2 odgrywają rolę w degradacji Nrf2. Kluczową domenę stanowi obszar Neh1, który obejmuje strukturę CNC-bZip, umożliwiającą wiązanie Nrf2 z jądrowym DNA, po wcześniejszej translokacji do jądra komórkowego. Przy C-końcu zlokalizowana jest domena Neh3, wykazująca możliwość wiązania się z chromo-ATPazą, działającą jako koaktywator transkrypcyjny dla Nrf2.

W warunkach fizjologicznych Nrf2 występuje w cytoplazmie w formie kompleksu z białkiem wiążącym Keap1. Oddziaływanie między czynnikiem transkrypcyjnym oraz białkiem represorowym zachodzi na poziomie domeny Neh2 (Nrf2) oraz domeny DGR, nazywanej inaczej Kelch (Keap1). Przyłączenie to następuje poprzez dwa motywy, występujące w cząsteczce Keap1 – ETGE (wysokie powinowactwo do wiązania) oraz DLG (niskie powinowactwo do wiązania). Poza domeną DGR w strukturze białka Keap1 występują również: i) domena N-końcowa – NTR, ii) region BTB/POZ odpowiadający za tworzenie, zdolnych do wiązania Nrf2, dimerów białek Keap1, iii) domena IVR znana jako interwencyjna, w której obecność dwóch reszt Cys273 i 288 jest istotna dla represyjnej aktywności Keap1, iv) region C-końcowy. Kompleks Nrf2-Keap1 może ulegać degradacji poprzez układ ubikwityna-proteasom. W warunkach stresu oksydacyjnego wiązanie między Nrf2 a Keap1 ulega zerwaniu jako rezultat działania elektrofilii i/lub RFT. Wyżej opisane zjawisko nosi nazwę kanonicznej ścieżki aktywacji. W ostatnim czasie wykazano również, że wpływ na aktywację Nrf2 mają zaburzenia dotyczące utrzymania homeostazy poprzez proces autofagii. Dysfunkcje autofagosomalne prowadzą do agregacji lub autofagosomalnej akumulacji p62/SQSTM1. Białko p62/SQSTM1 bierze udział w ścieżkach przekazywa-

nia sygnałów oraz posiada właściwość, która pozwala mu na „wylawianie” wewnątrz komórki wszystkich składników przeznaczonych do utylizacji i recyklingu. Dzieje się tak dzięki obecności w cząsteczce p62/SQSTM1 domeny ubikwitynowej (ang. *ubiquitin-associated domain*; UBA), która rozpoznaje białko ubikwitynę, wykorzystywane z kolei na drodze ligacji (ligazy ubikwitynowe) do „naznaczenia” komórkowych nieczystości. Jednocześnie białko to współzawodniczy z Nrf2 o przyłączenie do Keap1. W konsekwencji poprzez sekwestrację Keap1 przez p62/SQSTM1 dochodzi do przedłużonej aktywacji Nrf2. Zdolność do konkurencyjnego wiązania się p62/SQSTM1 do Keap1 jest zależna od poziomu występowania oraz modyfikacji potranslacyjnych kluczowych domen obu czynników. Ścieżka ta nosi nazwę niekanonicznej ścieżki aktywacji [2]. Udowodniono, że jest ona obecna między innymi w nowotworach oraz chorobach neurodegeneracyjnych [3]. Dodatkowo aktywacja Nrf2 może zachodzić zarówno jako wynik zmian konformacyjnych białka Keap1 oraz akumulacji p62/SQSTM1, jak i fosforylacji samego Nrf2 przy udziale kinaz takich jak: kinaza fostatydiloinozytolu (PI3K), kinaza białkowa C (PKC), kinaza białkowa umiejscowiona w siateczce śródplazmatycznej (PERK) oraz kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK). Uwolniona forma Nrf2 nie ulega ubikwitynacji, co uniemożliwia proces proteolitycznej degradacji. W konsekwencji następuje translokacja Nrf2 do jądra komórkowego, w którym tworząc heterodimer z małym białkiem Maf (protoonkogen c-Maf), przyłącza się do sekwencji ARE. Następuje inicjacja transkrypcji określonych genów, kontrolujących ekspresję wielu białek wykazujących działanie cytoprotekcyjne, m.in. S-transferazy glutationowej (GST), reduktazy NAD(P)H:chinon 1 (NQO1), oksygenazy hemowej 1 (HO-1) oraz syntetazy γ -glutamylcysteinowej (γ -GCS) [4].

Pomimo coraz większej wiedzy na temat regulacji szlaku sygnałowego Nrf2 do tej pory tylko fumaran

dimetylu (DMF, *Tecfidera*) został zarejestrowany jako lek działający bezpośrednio na Nrf2. Preparaty zawierające fumaran dimetylu znalazły zastosowanie w leczeniu stwardnienia rozsianego. Wprowadzenie nowych terapii stanowi nadal dość duży problem ze względu na zróżnicowany poziom ekspresji Nrf2 w zależności od stanu fizjologicznego oraz patologicznego, dlatego odpowiednie zaplanowanie i ukierunkowanie manipulacji ścieżką Nrf2 ma kluczowe znaczenie w tworzeniu skutecznego reżimu leczenia. Nie ulega jednak wątpliwości, że Nrf2 może spełniać bardzo ważną rolę w terapii oraz prewencji wielu chorób cywilizacyjnych, do których należą m.in.: choroby sercowo-naczyniowe, nowotwory, schorzenia neurodegeneracyjne i cukrzyca, przewlekła choroba nerek oraz wątroby [5].

Modulacja Nrf2 a prewencja i leczenie nowotworów

Ukierunkowanie oddziaływania substancji na Nrf2 w odniesieniu do chorób nowotworowych uzależnione jest od czasu, a także od stadium rozwoju procesu nowotworowego. Wykorzystanie farmakologicznej aktywacji Nrf2 pozostaje ważnym aspektem chemoprewencji, natomiast coraz częściej wskazuje się, że w niektórych typach nowotworów konstytutywna ekspresja Nrf2 występuje na wysokim poziomie. Dlatego też zastosowanie potencjalnych inhibitorów ścieżki może mieć korzystny wpływ na efekt terapeutyczny.

W przypadku nowotworu okres od inicjacji do pojawienia się pełnoobjawowego stanu chorobowego bardzo często może wynosić wiele miesięcy lub nawet lat. Najistotniejszą przyczyną zapoczątkowania procesu kancerogenezy są mutacje w obrębie genów, które prowadzą do nieprawidłowego rozwoju komórek. Konsekwencją tego procesu jest nabycie przez komórki cech takich jak nadmierna proliferacja, brak apoptozy, indukcja angiogenezy, zmiana metabolizmu, a także zdolność do inwazji odległych tkanek i powstawania przerzutów, będących cechami charakterystycznymi dla komórek nowotworowych [6]. Uszkodzenia materiału genetycznego wywoływane są głównie przez kancerogeny oraz ich metabolity. Substancje te w warunkach fizjologicznych ulegają detoksykacji oraz eliminacji, dzięki aktywności enzymów, których ekspresja jest zależna od ścieżki sygnałowej Nrf2. W przypadku długotrwałego narażenia mechanizmy obronne mogą jednak nie być wystarczające. Dlatego też alternatywą dla klasycznych leków przeciwnowotworowych,

które podaje się w różnych stadiach zaawansowania choroby, jest stosowanie naturalnych lub syntetycznych małowcząsteczkowych substancji, mających na celu zahamowanie lub odwrócenie procesu kancerogenezy na jego wczesnych etapach. Strategia ta nosi nazwę chemoprewencji [7]. Aktywacja czynnika Nrf2 w odpowiedzi na stres oksydacyjny oraz czynniki chemoprewencyjne jest jednym z przykładów tej strategii. Poprzez indukcję czynnika można doprowadzić do usunięcia toksycznych substancji, w tym także wolnych rodników, mogących powodować uszkodzenie DNA. Do dnia dzisiejszego przeprowadzono setki badań *in vitro* i *in vivo*, mających na celu ocenę właściwości związków aktywujących Nrf2. Co ważne, większość z tych substancji lub ich metabolity stanowią związki o charakterze elektrofilowym, oddziaływujące z resztami cysteinowymi lub małe peptydy wiążące się do białka Keap1 [8]. Do tej pory działanie kilku związków zostało poddane ocenie podczas badań klinicznych, były to: sulforafan (naturalny izotiocyjanian) u pacjentów z nowotworami głowy i szyi [ClinicalTrials.gov; NCT03182959] oraz prostaty [NCT01265953], bardoksolon metylu - CDDO-Me (syntetyczny triterpenoid) w leczeniu zaawansowanych guzów litych oraz limfoidalnych [NCT00508807], RTA 408 (syntetyczny triterpenoid) w terapii nowotworów płuc [NCT02029729] oraz fumaran dimetylu (syntetyczny) u osób z glejakiem [NCT02337426] i przewlekłą białaczką limfatyczną [NCT02784834]. Przeprowadzone w Chinach badania kliniczne dowiodły, że spożywanie kiełków brokułów zawierających powyżej 60% glukorafaniny, będącej prekursorem sulforafanu zmniejszało ryzyko powstawania adduktów aflatoksyny-DNA, co skutkowało zmniejszeniem zapadalności na nowotwór wątroby [9]. Dodatkowo, Sharma i wsp. [10] sugerują, że 4-hydroksynonenal, będący produktem procesu peroksydacji lipidów, pełni kluczową rolę w biologicznej aktywności SF, obejmującą selektywną cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych, poprzez ścieżki sygnalizacyjne, zapewniające specyficzne ukierunkowanie na ich uśmiercanie, równocześnie zwiększając efektywność mechanizmów obronnych w komórkach prawidłowych. Mechanizm działania kolejnego z przebadanych związków RTA 408 został przedstawiony przez grupę badawczą Probst i wsp. [11]. Badania wykazały, że RTA 408 okazał się być modulatorem antyoksydacyjno-zapalnym (ang. *antioxidant inflammation modulator*; AIM), który poprzez wiązanie się z Keap1 hamuje proteosomalną

degradację Nrf2, wykazując w ten sposób działanie przeciwnowotworowe. Co ciekawe, dla modeli z delecją lub mutacją białka Keap1 obserwowano zwiększenie aktywności Nrf2, przy jednoczesnym braku wzrostu innych onkogennych protein, jak na przykład IKK β i Bcl2 [12]. Wykazano również aktywację ścieżki Nrf2 pod wpływem ksantohumolu, związku powszechnie występującego w szyszkach chmielu, w prawidłowych komórkach wątrobowych THLE-2. Konsekwencją aktywacji tego szlaku sygnalizacyjnego jest wzrost poziomu enzymów II fazy metabolizmu, dzięki czemu ksantohumol wykazuje działanie chemoprewencyjne [13].

Konstrytuwna ekspresja Nrf2 w komórkach nowotworowych

Badania nad bezpiecznym i skutecznym leczeniem, w którym punktem uchwytu jest Nrf2 są nadal prowadzone. Z uwagi na możliwość promowania rozwoju guzów oraz przerzutów poprzez aktywatory czynnika Nrf2, konieczne jest staranne zaplanowanie schematu dawkowania oraz dostosowanie terapii do stadium rozwoju nowotworu.

Podczas intensywnego wzrostu komórki nowotworowe wykazują zwiększone zapotrzebowanie energetyczne, którego doskonałym źródłem są mitochondria. Zwiększona aktywność mitochondrialna skutkuje wzrostem ilości RFT powstających w łańcuchu oddechowym. Jeśli temu procesowi nie będzie towarzyszyła wzmocniona odpowiedź antyoksydacyjna albo system sprawnie działających enzymów antyoksydacyjnych, może dojść do wyłączenia cyklu komórkowego lub indukcji apoptozy, co w przypadku komórek nowotworowych byłoby korzystnym zjawiskiem. Niestety,

we wcześniejszych analizach wykazano wzrost konstytutywnej ekspresji Nrf2 w komórkach nowotworowych wielu narządów, która może być spowodowana zmniejszeniem interakcji Nrf2 z Keap1, w wyniku wystąpienia mutacji w genach [14]. W konsekwencji, wzrost odpowiedzi antyoksydacyjnej, poprzez aktywację Nrf2, zapewnia specyficzną ochronę komórek nowotworowych. Zwiększoną aktywność Nrf2 w komórkach nowotworowych wraz z mechanizmami odpowiedzialnymi za wystąpienie tego zjawiska przedstawiono w tabeli I.

Oporność wielolekowa a Nrf2

Poważnym problemem terapii nowotworów jest oporność komórek na zastosowane leczenie, wynikająca w większości przypadków z właściwości farmakokinetycznych chemioterapeutyków [14]. Substancje te ze względu na wąski indeks terapeutyczny, nie osiągają optymalnego stężenia w komórkach docelowych. Zjawisko to możemy tłumaczyć zbyt nasilonym metabolizmem, ograniczonym poziomem aktywacji proleków czy mikrośrodowiskiem nowotworu. Dodatkowo, poważny problem stanowi zjawisko oporności wielolekowej – MDR (ang. *multi-drug resistance*), które najczęściej spowodowane jest przez refluks ksenobiotyków do przestrzeni pozakomórkowej. Głównymi białkami odpowiadającymi za transport ksenobiotyków poza komórkę są białka z rodziny ABC (ang. *ATP-binding cassette transporter*), zawierające w swojej strukturze kasetę wiążącą ATP. Głównymi transporterami ABC są: glikoproteina P (MDR-1/P-gp lub ABCB1), białko MRP (ang. *multidrug resistance protein lub ABCC1*) oraz BCRP (ang. *breast cancer resistance protein lub ABCG2*). Przeprowadzone

Tabela I. Genetyczne zmiany w szlaku Nrf2 skutkujące wysoką ekspresją *NFE2L2* i rodzaje nowotworów, w których zostały one opisane [5]

Table I. Genetic alternations in Nrf2 pathway genes resulting in high expression of *NFE2L2* and the tumor types in which they have been described [5]

Gen	Zmiana	Typ nowotworu
<i>Keap1</i>	mutacje somatyczne	płuc, piersi, okrężnicy, jajników, prostaty, wątroby, endometrium, głowy i szyi
	hipermetylacja promotora	płuc, prostaty, piersi, okrężnicy, głowy i szyi, tarczycy
	delecja CNV	głowy i szyi
<i>NFE2L2</i>	mutacje somatyczne	głowy i szyi, płuc, nerek, gardła, endometrium, przelyku
	amplifikacja CNV	płaskonabłonkowy nowotwór płuc
	podczas procesu splicingu	płuc, głowy i szyi

badania wykazały, że Nrf2 wpływa na wzrost ekspresji szczególnie dwóch ostatnich białek, a w konsekwencji na wzrost oporności komórek nowotworowych na leczenie [15]. Udowodniono, iż zastosowanie apigeniny, będącej inhibitorem Nrf2 wraz z dokсорubicyną w komórkach nowotworowych wątroby prowadziło do zmniejszenia wielkości guza, w porównaniu do terapii wykorzystującej tylko dokсорubicynę [16]. Podobne rezultaty otrzymano w badaniach przeprowadzonych przez Zhu i wsp. [17] po zastosowaniu triptolidu. Związek ten w stężeniach niewykazujących działania cytotoksycznego zwiększał wrażliwość komórek niedrobnokomórkowego nowotworu płuc na cisplatynę, etopozyd oraz epirubicynę. Kamptotecyna, inhibitor topoisomerazy, będąca równocześnie inhibitorem ścieżki sygnałowej Nrf2 zwiększała wrażliwość komórek nowotworu wątroby na 5-fluorouracyl oraz epirubicynę. Podobne efekty terapeutyczne osiągnięto stosując kombinację DMC (2',4'-Dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone – wyizolowany z *Cleistocalyx operculatus*) z 5-fluorouracylem [18]. Co ciekawe, Yu i wsp. [19] odkryli, że zastosowanie kwasu walproinowego, powszechnie stosowanego w leczeniu padaczki, uwrażliwia nowotworowe komórki wątroby na terapię protonową. Natomiast metformina, pochodna biguanidu szeroko stosowana u pacjentów z cukrzycą, uwrażliwia komórki nowotworu płuc na działanie cisplatyny, poprzez inhibicję Nrf2 [20].

Nrf2 w procesach neurodegeneracyjnych

Podobnie jak w przypadku procesów nowotworowych, rola Nrf2 w procesach neurodegeneracyjnych jest złożona. Ważnym aspektem jest korelacja spadku aktywności Nrf2 wraz z wiekiem. Z upływem lat maleje reakcja na stres oksydacyjny jak również zostają zaburzone funkcje nerwowych komórek macierzystych [21]. W chorobach neurodegeneracyjnych Nrf2 ulega aktywacji lub supresji w zależności od typu komórek oraz stadium zaawansowania schorzenia. U pacjentów dotkniętych chorobą Alzheimera (AD) wykazano spadek ekspresji *NQO1* i *HO-1* w komórkach mózgowych, jak również udowodniono brak translokacji Nrf2 do jądra komórkowego. W chorobie Parkinsona (PD) w istocie czarnej, poziomy *NQO1*, *HO-1* i *PRDX* (*peroksydaza*) są konstytutywnie podwyższone, przy jednoczesnym umiejscowieniu Nrf2 w jądrze. Natomiast wzrost ekspresji *Nrf2* oraz *NQO1* zaobserwowano w części makrofażów oraz astrocytów tylko w fazie aktywnych zmian stwardnienia rozsianego (SM). Nieco

inaczej przedstawiają się poziomy białka Nrf2, ponieważ są one zmniejszone w pierwotnej korze ruchowej i rdzeniu kręgowym pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym. Rozbieżności te można tłumaczyć specyficznością profilu aktywacji dla różnego rodzaju komórek oraz regionu mózgu, a także etapem rozwoju choroby, w którym zostały przeprowadzone analizy [22,23]. Z założenia reaktywność szlaku Nrf2 maleje wraz z wiekiem, dlatego aktywacja Nrf2 może pojawiać się na wczesnym etapie, a ustępować w późniejszych stadiach rozwoju schorzenia. Dowiedzono, że niektóre farmakologiczne aktywatory Nrf2 mogą poprawić fenotypy neurodegeneracyjne. Wykazano m.in. znaczną poprawę pamięci oraz zmniejszenie tworzenia blaszek β -amyloidu u transgenicznych myszy z AD pod wpływem bardoksolonu metyloamidu – CDDO-MA, który jest zaliczany do syntetycznych triterpenoidów. Podobne działanie wykazuje pueraryna (naturalnie występujący fitoestrogen), sulforafan, orientina (naturalny flawonoid) oraz baikalaina (naturalny flawonoid). Etyloamid oraz trifluoroetyloamid bardoksolonu wykazywały protekcyjny wpływ na myszy typu dzikiego, lecz nie na *Nrf2*^{-/-} po zadziałaniu 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyny w PD [24,25]. Jedynym lekiem, będącym aktywatorem Nrf2, który przeszedł przez III fazę badań klinicznych, jest fumaran dimetylu, wykorzystywany w terapii SM. Ostatnie doniesienia wskazują jednak na korzystny wpływ zastosowania sulforafanu, CDDO-TFEA oraz matryny (naturalny alkaloid) w SM. Dlatego też ciekawym pozostaje fakt, że *Tecfidera* pozostaje jedynym preparatem zarejestrowanym przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*), pomimo tego, że nie jest ona najsilniejszym aktywatorem Nrf2. Podejrzewa się, że może to być wynikiem niezależnego od Nrf2 działania immunomodulującego, efektów synergistycznych z innymi szlakami, jakie wykazuje DMF lub zróżnicowanego stopnia ekspresji Nrf2 zależnej całkowicie od stadium choroby [26]. W badaniach Yao i wsp. [27] udowodniono, że ksantohumol wykazuje umiarkowaną zdolność do wychwytywania wolnych rodników w warunkach *in vitro* jak również wzrost aktywności enzymów cytoprotekcyjnych, indukowanych przez Nrf2, w neuropodobnej linii komórkowej PC12.

Podwójna rola Nrf2 w cukrzycy

Zwiększony stres oksydacyjny jest cechą charakterystyczną dla hiperglikemii, która może prowadzić do dysfunkcji komórkowych oraz zmian metabo-

licznych w wielu tkankach. Dlatego też dysregulacja ścieżki Nrf2 występuje również w tym schorzeniu. Podobnie jak w przypadku chorób neurodegeneracyjnych oraz nowotworowych rola Nrf2 w cukrzycy jest złożona i zależna od rodzaju komórek oraz tkanek. Umożliwia to zastosowanie farmakologicznych induktorów lub inhibitorów ścieżki w celu uzyskania lepszych efektów terapeutycznych oraz zmniejszenia ryzyka późnych powikłań. Wykazano, że w mysim modelu cukrzycy typu I indukowanym przez streptozotocynę, sulforafan oraz aldehyd cynamonowy (naturalnie występujący flawonoid) hamują procesy utleniania, co w konsekwencji prowadziło do redukcji uszkodzeń oraz przywrócenia prawidłowej czynności nerek. Doustne podanie bardoksolonu imidazolu – CDDO-Im skutkowało indukcją aktywności Nrf2, czego konsekwencją była atenuacja fenotypu cukrzycowego u myszy *Lepr(db/db)*. Zarówno CDDO-Im jak i CDDO-Me (bardoksolon metylu) oraz oltipraz i kurkumina poprawiały wrażliwość komórek na insulinę oraz tolerancję glukozy w diecie genetycznej, jak i wysokotłuszczowej w indukowanych modelach cukrzycowych. Co ciekawe, u myszy *Keap1flox / -*, u których konstytutywna ekspresja Nrf2 jest na wyższym poziomie, wystąpienie cukrzycy po skrzyżowaniu z myszami *db/db* było opóźnione. Z drugiej strony, przeprowadzono badania, w których wyciszenie *Keap1* wzmagało wystąpienie cukrzycy u myszy *Lep(ob/ob)* oraz u myszy na diecie bogatotłuszczowej. Wyniki te wskazują, że czynniki dietetyczne oraz genetyczne kontrolujące ścieżkę Nrf2 mogą wpływać na początek i rozwój choroby w różny sposób [28-31]. W badaniach przeprowadzonych przez More i wsp. [32] udowodniono, że zastosowanie CDDO-Me poprawia czynność nerek oraz zmniejsza masę ciała u pacjentów ze zdiagnozowaną nefropatią cukrzycową, badanie to jednak zostało przerwane ze względu na zwiększone ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych. II faza badań klinicznych przeprowadzonych u pacjentów z rozwiniętą nefropatią cukrzycową, wykazała, że zastosowanie bardoksolonu metylu prowadzi do poprawy parametrów nerkowych [33]. Niestety przeprowadzenie III fazy badań klinicznych uniemożliwiło zbyt duże ryzyko wystąpienia objawów ze strony układu sercowo-naczyniowego [34]. W randomizowanych badaniach klinicznych, przeprowadzonych u osób ze zdiagnozowaną cukrzycą, zaobserwowano spadek poziomu RFT oraz wzrost potencjału antyoksydacyjnego w osoczu po zastosowaniu resweratrolu w dawce 800 mg/dzień.

Ponadto, poziom Nrf2 i dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) uległ znaczącemu wzrostowi. Resweratrol nie miał natomiast istotnego wpływu na metabolizm i parametry antropometryczne z wyjątkiem znacznego zmniejszenia masy ciała, BMI i poziomów ciśnienia krwi. Nie zaobserwowano również żadnych poważnych zdarzeń niepożądanych [35].

W tym miejscu warto zauważyć, iż poprawa specyficzności oraz zastosowanie leków, których mechanizm oparty byłby na ścieżce Nrf2 w odpowiednim kontekście terapeutycznym może dawać pozytywne wyniki w profilaktyce późnych powikłań cukrzycowych. Należy również zwrócić szczególną uwagę, że niektóre powszechnie stosowane w cukrzycy leki z grupy inhibitorów dipeptydylopeptydazy 4, takie jak sitagliptyna oraz saksagliptyna, a także kwas α -liponowy, znane ze swych właściwości antyoksydacyjnych, indukują przedłużoną aktywację Nrf2. W tym przypadku nadmierna aktywacja ścieżki sygnałowej może prowadzić do zwiększonego ryzyka wystąpienia przerzutów u pacjentów cukrzycowych z już rozwiniętym nowotworem [36].

Nrf2 w chorobie sercowo-naczyniowej

Choroby sercowo-naczyniowe obejmują ponad 100 różnych schorzeń narządów oraz tkanek układu krążenia. Podobnie jak inne choroby przewlekłe, mogą się one rozwijać przez wiele lat. Charakterystyczną cechą dla chorób układu naczyniowego jest uszkodzenie oksydacyjne komórek śródbłonna naczyń oraz kardiomiocytów, co może prowadzić do nieprawidłowej czynności serca oraz skutkować uszkodzeniem naczyń krwionośnych i niewydolnością serca. Wykazano, że farmakologiczna aktywacja Nrf2 za pośrednictwem triptolidu, resweratrolu i kwasu α -liponowego wpływa korzystnie na odbudowę mięśnia sercowego w ostrej niewydolności serca, jak również zwiększa ekspresję genu *HO-1* w komórkach macierzystych [37].

Nrf2 w przewlekłej chorobie nerek oraz wątroby

Przewlekły stres oksydacyjny oraz stan zapalny są również charakterystycznymi objawami przewlekłej choroby nerek i wątroby. CDDO-Me nadal stanowi najbardziej obiecujący związek, który osiągnął II fazę badań klinicznych w przewlekłej chorobie nerek, u pacjentów, u których nie występowały sercowe czynniki ryzyka [38]. Jego mechanizm działania stanowi hamowanie procesu ubikwitynacji, a w konsekwencji

zahamowanie degradacji Nrf2. W badaniach przeprowadzonych przez Eun i wsp. [39] na modelach mysich wykazano, że resweratrol będący aktywatorem Nrf2 chroni przed uszkodzeniem nerek związanym z wiekiem, poprzez zmniejszenie albuminurii i wzrost klirensu kreatyniny. Dodatkowo zmiany histologiczne, takie jak stwardnienie kłębuszków nerkowych i zwłóknienie kanalikowo-śródmiąższowe, naciek komórek zapalnych oraz apoptoza zostały osłabione. W przypadku chorób wątroby, udowodniono na modelach mysich, u których wywołano niealkoholowe stłuszczenie wątroby, że CDDO-Im chroni komórki wątroby przed uszkodzeniem wywołanym przez leki, jak również redukuje kumulację lipidów [40].

Podsumowanie

W literaturze opisano wiele przykładów modulacji Nrf2 poprzez naturalne i syntetyczne związki. Dowiedziono, iż aktywacja Nrf2 zapewnia ochronę przed stresem oksydacyjnym w chorobach powiązanych z przewlekłym stanem zapalnym oraz wytwarzaniem RFT. Niestety, przedłużona aktywacja tej ścieżki sygnalizacyjnej może również powodować zmiany metaboliczne, które przyczyniają się do progresji choroby. Stąd w przypadku wykorzystania w terapii

substancji modulujących poziom czynnika Nrf2 istotne jest dopasowanie oddziaływania do typu schorzenia i stopnia jego zaawansowania.

Podziękowania / Acknowledgments

Dziękujemy prof. Wandzie Baer-Dubowskiej za krytyczne uwagi dotyczące manuskryptu.

Źródło finansowania / Source of funding

Praca powstała podczas realizacji projektu 2016/21/NZ5/01390 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Konflikt interesów / Conflict of interest

Brak/None

Adres do korespondencji / Correspondence address

✉ Violetta Krajka-Kuźniak
Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej,
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu,
ul. Święcickiego 4; 60-781 Poznań
☎ (+48 61) 854 66 21
✉ vkrajka@ump.edu.pl

Piśmiennictwo/References

1. Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. *Mutat Res.* 2005;591(1-2):93-102.
2. Silva-Islas C, Maldonado PD. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol Res.* 2018;134:92-9.
3. Dodson M, Zhang DD. Non-canonical activation of NRF2: New insights and its relevance to disease. *Curr Pathobiol Rep.* 2017;5(2):171-6.
4. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, et al. 1997. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 236:313-22.
5. Dodson M, de la Vega MR, Cholanians AB. Modulating NRF2 in Disease: Timing Is Everything. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2018; annurev-pharmtox-010818-021856. [Epub ahead of print]
6. Hanahan D, Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*,2011;144:646-74.
7. Sporn MB, Suh N. Chemoprevention: an essential approach to controlling cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:537-43.
8. de la Vega MR, Dodson M, Chapman E. NRF2-targeted therapeutics: new targets and modes of NRF2 regulation. *Curr Opin Toxicol.* 2016;1:62-70.
9. Kensler TW, Egner PA, Agyeman AS, et al. Keap1-nrf2 signaling: A target for cancer prevention by sulforaphane. *Top Curr Chem.* 2013;329:163-77.
10. Sharma R, Sharma A, Chaudhary P, et al. Role of 4-hydroxynonenal in chemopreventive activities of sulforaphane. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(11-12):2177-85.
11. Probst BL, Trevino I, McCauley L, et al. RTA 408, A Novel Synthetic Triterpenoid with Broad Anticancer and Anti-Inflammatory Activity. *PLoS One.* 2015;10(4):e0122942.
12. Milkovic L, Zarkovic N, Saso L. Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biol.* 2017;12:727-32.
13. Krajka-Kuźniak V, Paluszczak J, Baer-Dubowska W. Xanthohumol induces phase II enzymes via Nrf2 in human hepatocytes in vitro. *Toxicol In Vitro.* 2013;27(1):149-56.
14. Krysztosiak A, Krajka-Kuźniak V. When defense becomes dangerous – transcription factor Nrf2 and cancer. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2015;69:140-52.
15. Zahreddine H, Borden KL. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front Pharmacol.* 2013;4:28.

16. Gao AM, Zhang XY, Ke ZP. Apigenin sensitizes BEL-7402/ADM cells to doxorubicin through inhibiting miR-101/Nrf2 pathway. *Oncotarget*. 2017;8(47):82085-91.
17. Zhu J, Wang H, Chen F, et al. Triptolide enhances chemotherapeutic efficacy of antitumor drugs in non-small-cell lung cancer cells by inhibiting Nrf2-ARE activity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;358:1-9.
18. Wei X, Mo X, An F. 2',4'-Dihydroxy-6'-methoxy-3',5'-dimethylchalcone, a potent Nrf2/ARE pathway inhibitor, reverses drug resistance by decreasing glutathione synthesis and drug efflux in BEL-7402/5-FU cells. *Food Chem Toxicol*. 2018;119:252-9.
19. Yu JI, Choi C, Shin SW, et al. Valproic Acid Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Proton Therapy by Suppressing NRF2 Activation. *Sci Rep*. 2017;7(1):14986.
20. Zhang J, Jiao K, Liu J, et al. Metformin reverses the resistance mechanism of lung adenocarcinoma cells that knocks down the Nrf2 gene. *Oncol Lett*. 2018;16(5):6071-80.
21. Corenblum MJ, Ray S, Remley QW, et al. Reduced Nrf2 expression mediates the decline in neural stem cell function during a critical middle-age period. *Aging Cell*. 2016;15(4):725-36.
22. Johnson DA, Johnson JA. Nrf2--a therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med*. 2015;88(Pt B):253-67.
23. Sarlette A, Krampfl K, Grothe C, et al. Nuclear erythroid 2-related factor 2-antioxidative response element signaling pathway in motor cortex and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008; 67(11):1055-62.
24. Burton NC, Kensler TW, Guilarte TR. In vivo modulation of the Parkinsonian phenotype by Nrf2. *Neurotoxicology*. 2006; 27(6): 1094-100.
25. Kaidery NA, Banerjee R, Yang L, et al. Targeting Nrf2-mediated gene transcription by extremely potent synthetic triterpenoids attenuate dopaminergic neurotoxicity in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*. 2013;8(2):139-57.
26. Schulze-Topphoff U, Varrin-Doyer M, Pekarek K, et al. Dimethyl fumarate treatment induces adaptive and innate immune modulation independent of Nrf2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(17):4777-82.
27. Yao J, Zhang B, Ge C, et al. Xanthohumol, a polyphenol chalcone present in hops, activating Nrf2 enzymes to confer protection against oxidative damage in PC12 cells. *J Agric Food Chem*. 2015;63(5):1521-31.
28. Shin S, Wakabayashi J, Yates MS, et al. Role of Nrf2 in prevention of high-fat diet-induced obesity by synthetic triterpenoid CDDO-imidazolide. *Eur J Pharmacol*. 2009;620(1-3):138-44.
29. Yu Z, Shao W, Chiang Y, et al. Oltipraz upregulates the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 [corrected](NRF2) antioxidant system and prevents insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet in C57BL/6J mice. *Diabetologia*. 2011;54(4):922-34.
30. Saha PK, Reddy VT, Konopleva M, et al. The triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid methyl ester has potent anti-diabetic effects in diet-induced diabetic mice and Lepr(db/db) mice. *J Biol Chem*. 2010;285(52):40581-92.
31. He HJ, Wang GY, Gao Y, et al. Curcumin attenuates Nrf2 signaling defect, oxidative stress in muscle and glucose intolerance in high fat diet-fed mice. *World J Diabetes*. 2012;3(5):94-104.
32. More VR, Xu J, Shimpi PC, et al. Keap1 knockdown increases markers of metabolic syndrome after long-term high fat diet feeding. *Free Radic Biol Med*. 2013;61:85-94.
33. Pergola PE, Krauth M, Huff JW, Ferguson DA, et al. Effect of bardoxolone methyl on kidney function in patients with T2D and Stage 3b-4 CKD. *Am J Nephrol*. 2011;33(5):469-76.
34. de Zeeuw D, Akizawa T, Audhya P, et al. Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease. *N Engl J Med*. 2013;369(26):2492-503.
35. Seyyedbrahimi S, Khodabandehloo H, Nasli Esfahani E, et al. The effects of resveratrol on markers of oxidative stress in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Acta Diabetol*. 2018;55(4):341-53.
36. Wang H, Liu X, Long M, et al. NRF2 activation by antioxidant antidiabetic agents accelerates tumor metastasis. *Sci Transl Med*. 2016;8(334):334ra51.
37. Shen Y, Liu X, Shi J, et al. Involvement of Nrf2 in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Int J Biol Macromol*. 2018;S0141-8130(18)32901-5.
38. Nezu M, Suzuki N, Yamamoto M. Targeting the KEAP1-NRF2 System to Prevent Kidney Disease Progression. *Am J Nephrol*. 2017;45(6):473-83.
39. Kim EN, Lim JH, Kim MY, et al. Resveratrol, an Nrf2 activator, ameliorates aging-related progressive renal injury. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(1):83-99.
40. Tang W, Jiang YF, Ponnusamy M, Diallo M. Role of Nrf2 in chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20:13079-87.