

Czynnik transkrypcyjny NF- κ B jako terapeutyczny punkt uchwytu

The NF- κ B transcription factor as a therapeutic target

Maria Narożna, Violetta Krajka-Kuźniak

Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

Streszczenie

Jądrowy czynnik transkrypcyjny kappaB (NF- κ B), odgrywa kluczową rolę w transkrypcji genów kodujących białka związanych ze stanem zapalnym, proliferacją komórkową i apoptozą. Zwiększona ekspresja i aktywacja NF- κ B jest spowodowana postępującym stanem zapalnym związanym z przebiegiem wielu chorób nowotworowych, w tym raka gruczołu sutkowego, okrężnicy, prostaty i skóry. Może wiązać się również z patogenezą chorób autoimmunologicznych, cukrzycą i chorobami naczyniowymi, w których stwierdzono konstytutywną aktywację NF- κ B. Blokowanie sygnalizacji NF- κ B stanowi więc atrakcyjną strategię rozwoju między innymi dla leków przeciwnowotworowych. W artykule przedstawiono charakterystykę i mechanizmy aktywacji NF- κ B oraz przegląd aktualnie stosowanych leków, których działanie wiąże się z ingerencją w ten szlak sygnalizacyjny, a także nowe możliwości inhibicji jego kluczowych elementów. (*Farm Współ 2019; 12: 92-101*)

Słowa kluczowe: NF- κ B, NLPZ, stany zapalne, nowotwory

Summary

Nuclear-kappa B factor (NF- κ B) is a transcription factor that plays a key role in expression of genes encoding proteins produced in response to pro-inflammatory stimuli and involved in cell proliferation and apoptosis. The increased NF- κ B expression and activity is associated with the progressive inflammation characteristic for many cancers, including mammary gland cancer, colon, prostate and skin cancer. It is also involved in the pathogenesis of autoimmune diseases, diabetes and vascular diseases in which constitutive activation of NF- κ B has been confirmed. Therefore, blocking of NF- κ B signaling pathway is considered an attractive cancer therapeutic strategy of many diseases. This paper summarizes proven mechanisms of known drugs acting on NF- κ B signaling pathway and presents new drugs designed to inhibit this pathway. (*Farm Współ 2019; 12: 92-101*)

Keywords: NF- κ B, NSAIDs, inflammation, cancers

NF- κ B jest jądrowym czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję genów kodujących białka związane z odpowiedzią na stres oksydacyjny, adhezję komórek, proliferację, apoptozę, bodźce wirusowe, bakteryjne, antygeny, promieniowanie UV oraz cytokiny, takie jak IL-2 (interleukina-2) i TNF- α (czynnik martwiczy guza- α) [1]. Niekontrolowana aktywacja szlaku sygnalizacyjnego NF- κ B jest związana z patogenezą chorób, takich jak: miażdżyca, astma, AIDS, cukrzyca, zapalna choroba jelit, udar, zanik mięśni [2], wstrząs septyczny, reumatoidalne zapalenie stawów [3] oraz wiele chorób autoimmunologicznych [4]. Nieprawidłowa transkrypcja NF- κ B została również oznaczona w próbkach biopsji błony śluzowej jelita

pacjentów z aktywną chorobą Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (IBD) [5]. Zaburzona ekspresja podjednostek NF- κ B została opisana w limfocytach T pacjentów z układowym toczniem rumieniowatym (SLE) [6]. Istniejące dowody wskazują na połączenie pomiędzy stanem zapalnym, a progresją nowotworową, co sprawia, że NF- κ B jest celem terapeutycznym w opracowywaniu nowych leków chemoprewencyjnych i/lub chemioterapeutycznych [7]. W komórkach nowotworowych gruczołu sutkowego, okrężnicy, trzustki, wątroby, jajnika, chłoniaka oraz czerniaka zaobserwowano konstytutywną ekspresję i aktywację NF- κ B. Udowodniono, iż bierze on udział w zwiększaniu proliferacji komórkowej,

blokowaniu apoptozy, promowaniu angiogenezy oraz warunkowaniu inwazyjności i skłonności do metastazy, stąd jedną ze strategii terapeutycznej może być zahamowanie molekularnych mechanizmów aktywacji tego szlaku [8].

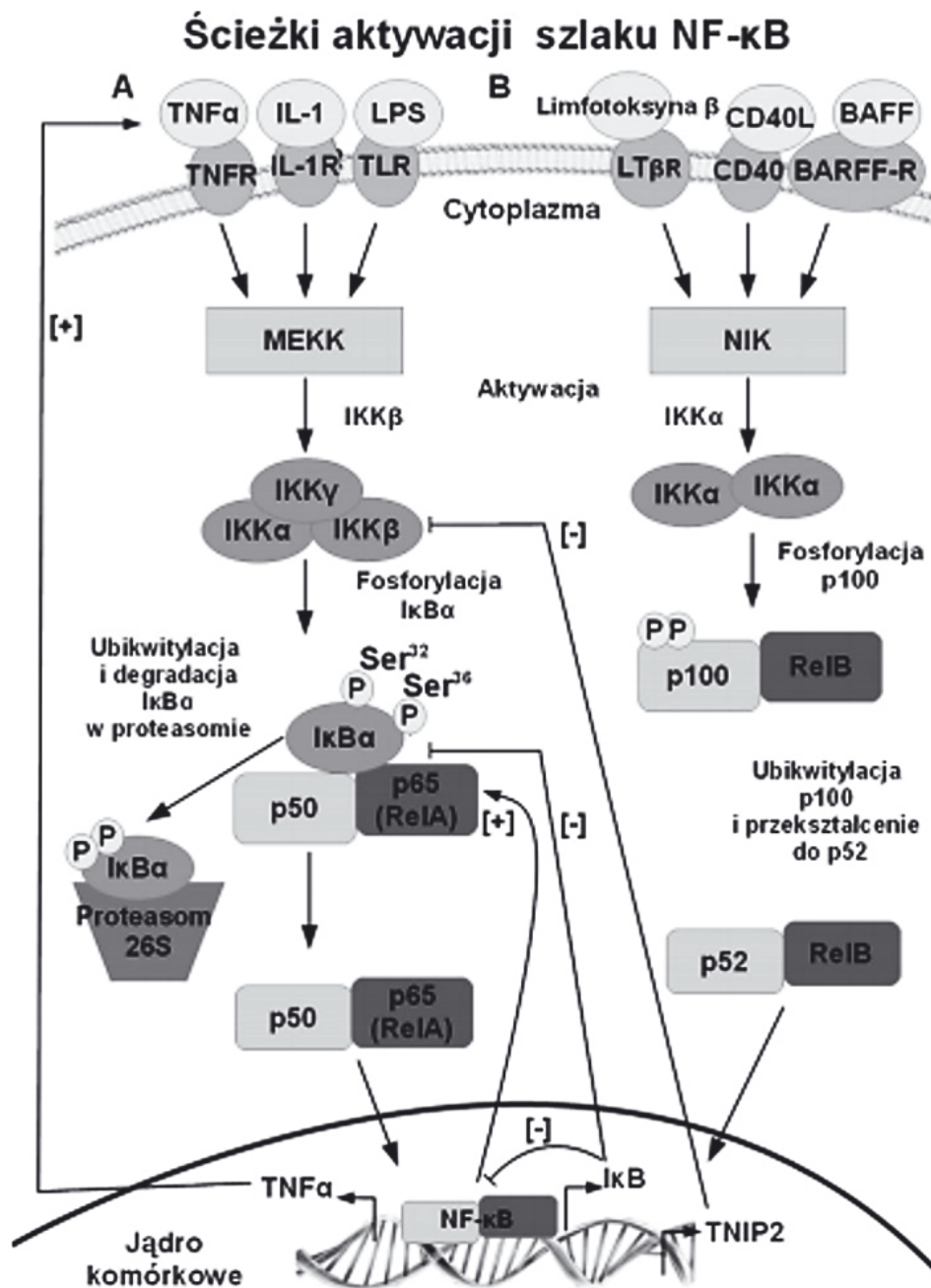
NF- κ B – budowa i aktywacja

Jądrowy czynnik transkrypcyjny- κ B został zidentyfikowany w 1986 r. przez Sen'a i Baltimore'a w genomie łańcucha lekkiego immunoglobuliny κ w limfocytach B [9]. W cytozolu komórki występuje w postaci homo- lub heterodimeru związanego ze swoistym białkiem inhibitorowym, I κ B [10]. Podjednostki NF- κ B składają się z białek rodziny Rel (p50, p52, p65 (RelA), c-Rel i RelB) i mają wspólną domenę RHD, składającą się z 300 aminokwasów, która nadaje NF- κ B zdolność do dimeryzacji oraz wiązania DNA. Białka rodziny Rel mogą tworzyć 15 różnych dimerów, z których heterodimer p50/p65 jest najbardziej aktywny. Każdy z tworzonych dimerów charakteryzuje się specyficznością wiązania określonej sekwencji DNA. Wykryto ponad 150 różnych bodźców indukujących aktywność NF- κ B [11], a dowiedziono istnienia ponad 500 genów pozostających pod jego kontrolą i zaangażowanych w regulację wzrostu, stanów zapalnych, kancerogenezy, apoptozy, syntezy cytokin, chemokin, komórek adhezyjnych, czynników wzrostu, onkogenów oraz białek pro- i antyapoptotycznych [12].

Aktywacja NF- κ B następuje poprzez kanoniczną (klasyczną) ścieżkę zainicjowaną przez NF- κ B1 (p50/p105) i niekanoniczny (alternatywny) szlak inicjowany przez NF- κ B2 (p52/p100), z których każda droga aktywacji powoduje różnorodne skutki biologiczne (rycina 1). Klasyczny szlak obejmuje dimery składające się z podjednostek p65, c-Rel i p50 oraz wymaga degradacji prototypowych białek I κ B, a także prekursora NF- κ B p50–p105. Głównym mechanizmem obronnym przed skutkami działania NF- κ B jest zatrzymywanie tych nieaktywnych dimerów w cytoplazmie komórki przez inhibitory κ B (I κ B). I κ B stanowią rodzinę białek złożonych z sześciu do siedmiu powtórzeń ankyrynowych, pośredniczących w interakcji z dimerami NF- κ B. Aktywowanie swoistych receptorów NF- κ B prowadzi do fosforylacji białek I κ B przez kompleks kinazy I κ B (IKK), który składa się z dwóch pokrewnych kinaz I κ B: IKK α i IKK β oraz podstawowego modyfikatora białka NF- κ B, NEMO (IKK γ). W przypadku p105 i p100, C-końcowa część tych białek ulega degradacji, uwalniając funkcjonalne podjednostki p50 i p52, które

są zdolne do wiązania sekwencji docelowych DNA w jądrze. Efektem fosforylacji białek inhibitorowych jest także ich degradacja na drodze ubiquitynacji i rozkładu proteolitycznego przez proteasom 26S. Wskutek odłączenia białka inhibitorowego I κ B od NF- κ B, dochodzi do odsłonięcia sekwencji NLS NF- κ B, co umożliwia jego translokację do jądra komórkowego, gdzie jako czynnik transkrypcyjny reguluje transkrypcję genów docelowych [13]. Niekanoniczna ścieżka aktywacji NF- κ B jest wysoce ewolucyjnie konserwatywna i kontrolowana przez geny regulacji procesów homeostatycznych organizmu, jak m.in. organogeneza układu limfatycznego, przeżywalność limfocytów B i metabolizm układu kostnego. Szlak ten jest aktywowany przez agonistów receptora czynnika martwicy nowotworu, w tym receptor limfotoksyny- β (LT β R), czynnik aktywujący limfocyty B (BAFF) i czynnik odpowiedzi immunologicznej zależnej od limfocytów T (CD40) [14]. Aktywacja niekanonicznego szlaku przebiega wolniej i zaczyna się od aktywacji kinazy indukującej NF- κ B (NIK) w odpowiedzi na połączenie specyficznego ligandu z receptorem (rycina 1). Fosforylacja IKK α za pośrednictwem NIK prowadzi do kolejnego przekształcania p100 do p52 i uwolnienia dimerów zawierających RelB oraz p52, które następnie mogą ulec translokacji wewnątrzjądrowej. W jądrze, aktywowany czynnik ulega serii modyfikacji potranslacyjnych, w tym fosforylacji, acetylacji i metylacji. Modyfikacje wpływają zarówno na siłę, jak i czas działania NF- κ B. RelA/p65 jest bezpośrednio fosforylowany przez zależną od cAMP kinazę białkową (PKA), podlega również indukowalnej acetylacji, przez co wykazuje słabsze oddziaływania z I κ B α [15]. Ze względu na możliwości regulacji szlaku NF- κ B na różnych poziomach jego aktywacji, począwszy od czynników stymulujących, aktywacji dimerów, poprzez kinazy, fosfatazy, ubiquitynację, po translokację jądrową, wiązanie do DNA, transferazę białkową i transferazę metylową, wzrasta zainteresowanie NF- κ B jako potencjalnym celem terapeutycznym [16].

Niewielka ilość specyficznych inhibitorów NF- κ B znajduje się obecnie w zastosowaniu klinicznym. Powszechnie stosowane są środki przeciwzapalne modulujące szlak NF- κ B w większości o nieudowodnionej specyficznosci na konkretnym etapie jego sygnalizacji, jedynie inhibicji w odniesieniu do końcowego efektu działania.



Rycina 1. Schemat szlaków aktywacji NF-κB, wskazujący obecne oraz potencjalne cele jego hamowania. Odmiennie bodźce powodują aktywację NF-κB poprzez kanoniczne (A) i niekanoniczne (B) szlaki sygnałowe. Zidentyfikowane zostały liczne inhibitory szlaku NF-κB zdolne do oddziaływania na obie ścieżki. Inhibitory dzielą się na te o szerokim zakresie oddziaływania i czynniki o selektywnym mechanizmie inhibitorowym, ukierunkowane na późniejsze etapy szlaku [40].

Figure 1. Schematic NF-κB pathways of activation that indicate potential and current targets for its inhibition. Various stimuli may result in activation of NF-κB through canonical (A) and noncanonical (B) signaling pathways. Numerous NF-κB inhibitors able to target both pathways have been already identified. Inhibitors vary from broad-range to those with a more precise inhibition, which can target the later stages of pathway activation [40].

1. Niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ)

Eikozanoidy to zróżnicowana grupa związków, których prekursorem jest kwas arachidonowy (AA). Należą do nich pro-zapalne prostaglandyny (PG), tromboksan i prostacykliny. Cyklooksigenaza (COX) katalizuje syntezę cyklicznego nadtlenku prostaglandynowego (PGHS) i tym samym, kontroluje jedną z głównych dróg metabolizmu AA. Z tego powodu jest głównym celem działania NLPZ. COX występuje w dwóch izoformach, COX-1 i COX-2, przy czym ten ostatni jest zaangażowany głównie w proces zapalny i proliferację komórkową. Z tego powodu w ostatnich latach opracowano selektywne inhibitory COX-2, które zapewniają taką samą skuteczność przeciwzapalną jak tradycyjne NLPZ, minimalizując jedynie ryzyko działań niepożądanych ze strony układu pokarmowego [17]. Należy zaznaczyć, iż z rynku wycofany został lek należący do wybiórczych inhibitorów COX-2, rofekoksyb. W wyniku inhibicji COX-2 u leczonych nim pacjentów dochodziło do blokowania syntezy prostacykliny, a występujące czynniki ryzyka ostrych powikłań naczyniowych mogły doprowadzić do zgonu [18].

Z drugiej strony, podkreśla się również rolę innego szlaku metabolicznego AA, szlaku 5-lipoksygenazy (5-LO), w wytwarzaniu i utrzymywaniu stanu zapalnego. Co więcej, obecnie uważa się, że COX-2 i 5-LO mają zbliżone funkcje nie tylko w stanach zapalnych, ale także w proliferacji i angiogenezie. Udowodniono, że COX-2 i 5-LO są wspólnie aktywowane w stanach zapalnych, także tych, które towarzyszą nowotworom, stąd potencjalnie korzystne może być zastosowanie ich jako czynników chemoprewencyjnych w profilaktyce nowotworów. PG, prostacykliny oraz tromboksan dodatkowo biorą udział w przekazywaniu bodźców bólowych, uwrażliwiając nocycceptory. NLPZ hamują akumulację leukocytów w miejscach zmienionych zapalnie, hamują aktywację i ekspresję receptorów, hamują angiogenezę i apoptozę oraz działanie reaktywnych form tlenu (RFT) [19]. Ekspresja genów kodujących te enzymy jest kontrolowana przez NF- κ B. Poza hamowaniem aktywności COX wykazują również zdolność hamowania aktywności IKK β , zapobiegania degradacji I κ B oraz blokowania translokacji jądrowej aktywnych podjednostek NF- κ B [20].

NLPZ można podzielić w zależności od ich wpływu na poszczególne izoenzymy cyklooksigenazy: COX-1 i COX-2 [21,22]:

1.1. COX-1 selektywne:

1.1.1. Kwas acetylosalicylowy

1.2. COX-nieselektywne:

1.2.1. Ketoprofen

1.2.2. Ibuprofen

1.2.3. Indometacyna

1.2.4. Naproksen

1.3. COX-2 selektywne:

1.3.1. Diklofenak

1.3.2. Meloksykam

1.3.3. Nabumeton

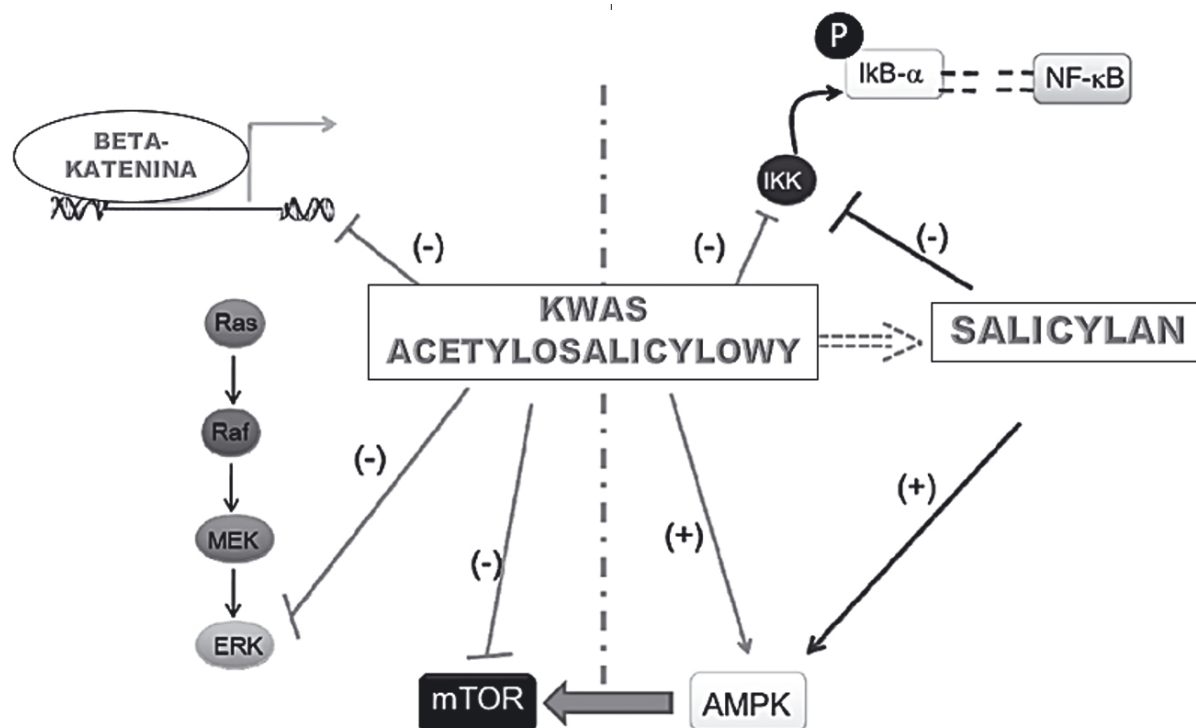
1.4. COX-2 wysoce selektywne:

1.4.1. Celekosykb.

1.1.1. *Kwas acetylosalicylowy*

Badania przeprowadzone przez Dovizio i wsp. (2013) dowodzą, iż kwas acetylosalicylowy (ASA) stosowany kilka lat w dawkach co najmniej 75 mg/dobę zmniejsza występowanie i śmiertelność z powodu raka okrężnicy. Biorąc pod uwagę krótki okres półtrwania ASA we krwi (ok. 20 minut) oraz zdolność jądrzastych komórek do ponownego syntetyzowania acetylowanego izoenzymu COX, wydaje się mało prawdopodobne, aby komórka jądrowa mogła być celem działania aspiryny. Mechanizmy działania ASA (rycina 2), jak hamowanie sygnalizacji NF- κ B, sygnalizacji Wnt/ β -katenina oraz acetylacji COX, sugerują, że odgrywają one rolę w jej działaniach chemoprewencyjnych [23].

Udowodniona została zdolność ASA do hamowania zarówno NF- κ B, jak i syntazy tlenu azotu (iNOS) oraz szeregu cytokin. Wiele przeprowadzonych badań dotyczyło oceny zdolności do hamowania inwazyjności komórek nowotworowych, w tym komórek raka gruczołu sutkowego, okrężnicy, przełyku i płuc. Badania wykonane przez Shi i wsp. (2017) udowodniły, że inwazyjność komórek raka gruczołu krokowego w trakcie stosowania ASA była hamowana poprzez jej mechanizm oddziaływania na enzymy proteolityczne zależne od aktywacji NF- κ B za pośrednictwem IKK- β . Leczenie ASA spowodowało spadek aktywacji NF- κ B, I κ B α oraz zmniejszenie translokacji NF- κ Bp65 do frakcji jądrowej. Dodatkowo, stosowanie ASA spowodowało znaczącą redukcję metaloproteinazy-9 (MMP-9) i dodatnią regulację tkankowych inhibitorów aktywności metaloproteinazy-1 (TIMP-1), które są enzymami proteolitycznymi przyczyniającymi się do degradacji macierzy pozakomórkowej i błony podstawnej podczas inwazji komórek i tworzeniu przerzutów. ASA



Rycina 2. Niezależne od cyklooksygenazy mechanizmy działania przeciwnowotworowego kwasu acetylosalicylowego i salicylanu [20]

Figure 2. COX-independent mechanisms of the antitumoral effects of acetylsalicylic acid and salicylate [20]

hamował ekspresję aktywatora plazminogenu typu urokinazy (uPA) oraz ekspresję inhibitora aktywatora plazminogenu 1 (PAI-1) w komórkach raka gruczołu krokowego [24].

1.2.1. Ketoprofen

W ostatnich latach szczególną uwagę poświęcono potencjałowi cytostaticznemu niesteroidowych leków przeciwzapalnych. Podczas badań prowadzonych przez Damjanovic i wsp. (2015) w celu sprawdzenia potencjału cytostaticznego ketoprofenu w leczeniu raka jelita grubego i raka szyjki macicy badano wpływ samego ketoprofenu oraz ketoprofenu w połączeniu z cisplatyną oraz 5-fluorouracylem. Wyniki potwierdziły, iż działanie antyproliferacyjne i/lub cytostaticzne różnych stężeń ketoprofenu na komórki nowotworowe linii Caco-2 i HeLa zależne są od aktywności NF-κB, od której jest zależna ekspresja COX-2. Hamowanie tego enzymu przez ketoprofen może stanowić znaczący etap synergistycznej kaskady terapeutycznej w celu zapobiegania rakom okrężnicy i szyjki macicy [25].

Pochodna ketoprofenu (ATB-352), uwalniająca H₂S w celu ochrony błony śluzowej żołądka podczas długotrwałej terapii została wykorzystana w badaniach Gugliandolo i wsp. (2017). Potwierdzili, iż podczas rozwoju choroby przyzębia będącej najczęstszą przyczyną utraty zębów u ludzi, następuje duże uszkodzenie tkanki związane z resorpcją kości, a w tkankach śluzówki dziąseł dochodzi do nadekspresji NF-κBp65, prozapalnych cytokiny oraz iNOS. Leczenie ATB-352 w dawce 20 mg/kg m.c. u szczurów zmniejszyło proces zapalny poprzez zahamowanie NF-κBp65, co w efekcie miało pozytywny wpływ na zmniejszenie resorpcji kości i uszkodzenie tkanki [26].

1.2.2. Ibuprofen

Modyfikacja istniejących NLPZ poprzez tworzenie pochodnych może znacznie poprawić efekt działania oraz zmniejszyć negatywne skutki uboczne związane z oddziaływaniem na układ pokarmowy. W badaniu przeprowadzonym przez Ouyanga'a i wsp. (2013), ibuprofen i jego pochodna zostały użyte w badaniu

raka okrężnicy. Szczury traktowano ibuprofenem (500ppm) lub p-ibuprofenem (900ppm) przez 20 tygodni i obserwowano wielkość guza. Barwienie immunofluorescencyjne i analiza Western blot wykazały, że zarówno ibuprofen, jak i p-ibuprofen tłumiły translokację jądrową β -kateniny w komórkach raka okrężnicy. Ponadto p-ibuprofen, hamował aktywację NF- κ B. Wyniki te sugerują, że tworzenie pochodnych ibuprofenu może być potencjalnie skuteczną, addycyjną strategią przeciwnowotworową [27].

Wysokie dawki ibuprofenu stosowane są w leczeniu mukowiscydozy, jednak jego mechanizmy molekularne są bardzo słabo poznane. Dauletbaev i wsp. (2010) potwierdzili, że ibuprofen hamuje aktywację NF- κ B, a tym samym obniża stymulację wytwarzania IL-8 w komórkach nabłonka oddechowego w zwłóknieniu torbielowatym. Podczas badania NF- κ B i IL-8 były stymulowane TNF- α lub IL-1 β . Zarówno TNF- α , jak i IL-1 β aktywowały NF- κ B i stymulowały produkcję IL-8. Ibuprofen wykazywał supresję aktywności transkrypcyjnej NF- κ B, jednak nie miał wpływu na stymulowane białko IL-8 [28].

1.3.1. Diklofenak

Diklofenak jest stosowany w leczeniu stanów zapalnych będących skutkiem urazów sportowych. Podczas badania Barcelos'a i wsp. (2017) przeprowadzono analizę wpływu diklofenaku na ścieżkę sygnalizacyjną czynników toll-podobnych receptorów (TLR), skutkującą aktywacją NF- κ B i produkcją kaskady prozapalnych cytokin. Zaawansowanie stanu zapalnego oceniano przez poziom mRNA COX-2, iNOS oraz IL-6. Potwierdzono, że diklofenak w leczeniu wstępnym może skutecznie łagodzić stan zapalny poprzez tłumienie szlaku sygnalizacyjnego TLR4-NF- κ B [29].

1.3.2. Meloksykam

Badania Liu i wsp. (2015) wykazały, że apoptoza komórek raka przełyku *in vitro* zachodziła w wyniku stosowania ASA, na drodze hamowania szlaku NF- κ B i w konsekwencji inhibicji COX-2. Kolejne badania miały na celu ustalić, czy podobne zmiany występują *in vivo* w guzach pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym przełyku (SCC), którzy przyjmowali 7,5 mg/dobę meloksykamu przez okres 10-14 dni przed operacją. Stosowanie meloksykamu spowodowało zwiększenie komórek apoptotycznych w nowotworach pacjentów zażywających lek. Ponadto zmniejszył on poziom jądrowego NF- κ B oraz COX-2 zarówno na poziomie

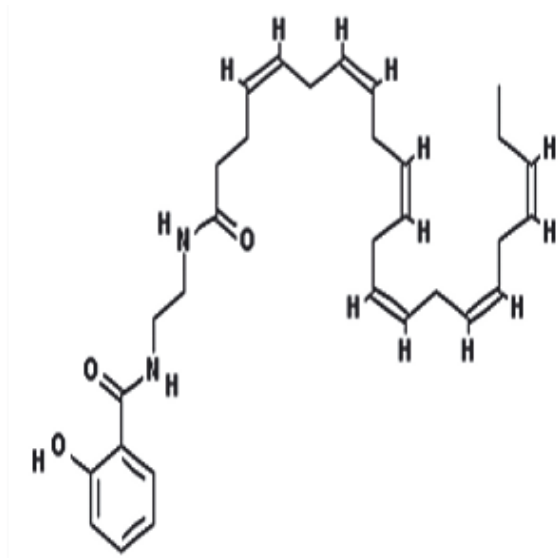
mRNA, jak i białka. Zwiększał również poziom cytozolowego białka I κ B. Stąd wniosek, iż meloksykam indukuje apoptozę w SCC przełyku *in vivo* poprzez hamowanie NF- κ B oraz COX-2 [30].

1.4.1. Celekoksyb

Selektywne inhibitory COX-2 są przepisywane w leczeniu choroby zwyrodnieniowej stawów. Silny ból spowodowany stanem zapalnym jest efektem wytwarzania eikozanoidów. W swoich badaniach, Attur i wsp. (2012) zidentyfikowali zróżnicowane szlaki eikozanoidów aktywowanych w chondrocytach chrząstki zdrowej i chrząstki pacjentów cierpiących na choroby zwyrodnieniowe stawów. Tkankę chrzęstną inkubowano w warunkach *ex-vivo* w celu zbadania spontanicznej i stymulowanej interleukiną-1 produkcji eikozanoidów w obecności różnych inhibitorów COX. Celekoksyb i indometacyna zwiększały akumulację leukotrienu B4 (LTB4) od dwóch do czterech razy. W przeprowadzonej analizie farmakogenomicznej zidentyfikowano około 90 cytokin i transkryptów, które uległy modulacjom w wyniku selektywnego zahamowania COX-2. Badania te po raz pierwszy wykazały, że chrząstka generuje liczne i zróżnicowane produkty eikozanoidów, a ponadto celekoksyb reguluje transkrypcję genów, które powiązane są bezpośrednio ze ścieżkami NF- κ B i czynnika transkrypcyjnego-1 (AP-1), co sugeruje ich mechanizm hamujący [31].

2. Edasalonexent – inhibitor NF- κ B, będący w III fazie badań klinicznych nad dystrofią mięśniową Duchenne'a

W dystrofii mięśniowej Duchenne'a (DMD), NF- κ B jest aktywowany w mięśniach szkieletowych od okresu niemowlęcego niezależnie od podłoża mutacji dystrofiny. Wywołuje stany zapalne i zwyrodnienie mięśni, hamując ich regenerację. Edasalonexent (CAT-1004) jest dwufunkcyjnym związkiem podawanym doustnie, który wiąże kowalencyjnie związki hamujące NF- κ B: kwas salicylowy (SA) i kwas dokozaheksaenowy (DHA) (rycina 3). Edasalonexent jest przeznaczony do hamowania aktywowanego NF- κ B po rozszczepieniu wewnątrzkomórkowym obu bioaktywnych czynników. Aktywowany NF- κ B reguluje ekspresję genów zaangażowanych w czynniki zapalne występujące podczas DMD, takie jak TNF- α , IL-1 β , MMP9 i białko homeostazy mięśniowej (Murf1). W badaniach przedklinicznych wykazano, że SA zapobiega atrofii mięśni za pośrednictwem NF- κ B oraz zmniejsza katabolizm



Rycina 3. Struktura 2D Edasalonexentu złożonego ze związanych kowalencyjnie związków hamujących NF- κ B: kwasu salicylowego (SA) i kwasu dokozaheksaenowego (DHA) [32]

Figure 3. 2D structure of Edasalonexent composed of covalently bounded NF- κ B inhibiting compounds: salicylic acid (SA) and docosahexaenoic acid (DHA) [32]

białek [32]. W przypadku DHA wykazano, że hamuje on szlaki prozapalne poprzez modulację aktywności NF- κ B. Ponadto, jest metabolizowany do eikozanoidów przeciwzapalnych [33], które także odgrywają rolę w regeneracji włókien mięśniowych. Dotychczas wykazano statystycznie istotną redukcję NF- κ B aktywowanego LPS, jak również zmniejszoną aktywność wiązania NF- κ Bp65 do DNA. Po 14 dniach zażywania 4000 mg/dobę, edasalonexent hamował niestymulowane docelowe geny NF- κ B i geny prozapalne u pacjentów z cukrzycą typu 2. Wykazano, że hamowanie NF- κ B z salicylanami poprawia parametry homeostazy glukozy [34]. W I fazie badań klinicznych u dorosłych wykazano, że edasalonexent jest bezpieczny i dobrze tolerowany, a także hamuje aktywowane szlaki NF- κ B, sugerując użyteczność w terapii DMD. Uważa się, że wykazanie hamowania NF- κ B u osób z DMD jest argumentem za zastosowaniem tego innowacyjnego związku chemicznego u pacjentów pediatrycznych z dystrofią mięśniową Duchenne'a [35].

3. Leki przeciwcukrzycowe hamujące ekspresję i aktywację NF- κ B

3.1. Metformina

Metformina jest doustnym lekiem hipoglikemizującym, pochodną biguanidu. Poprawia tolerancję glukozy w cukrzycy typu II poprzez zmniejszenie wytwarzania glukozy w wątrobie, w wyniku hamowania glukoneogenezy i glikogenolizy. Cukrzyca sprzyja zwiększonemu ryzyku i pogorszeniu rokowań wielu chorób nowotworowych, na co ma wpływ poziom insuliny oraz wysoki poziom glukozy we krwi. Metformina zwiększa wrażliwość tkanek na insulinę oraz stymuluje wewnątrzkomórkową syntezę glikogenu w wyniku działania na syntazę glikogenu. Zwiększa zdolność do transportu przez błonę wszystkich typów transporterów glukozy (GLUTs). Przeprowadzone przez Saengboonmee i wsp. (2017) badania *in vitro* na komórkach linii CCA (raka dróg żółciowych) wykazały hamowanie proliferacji po zastosowaniu metforminy. Po raz pierwszy potwierdzono, iż efektem działania metforminy jest podwyższenie poziomu NF- κ B p65 oraz STAT3 w cytoplazmie komórki. Zmniejszyła również poziom MMP2 oraz MMP7 poprzez mechanizmy aktywacji AMPK oraz przez fosforylację połączoną z hamowaniem transkrypcji STAT3 i NF- κ B. Badania te dostarczają argumentów ku rozważeniu rozpoczęcia stosowania metforminy w badaniach klinicznych jako potencjalnego czynnika metastatycznego i antyproliferacyjnego [36].

3.2. Dapagliflozyna

Jest silnym, wybiórczym i odwracalnym inhibitorem kotransportera 2 glukozy zależnego od jonów sodowych (SGLT2). SGLT2 ulega selektywnej ekspresji w cewkach nerkowych i jest odpowiedzialny za około 90% zachodzącego w nerkach wchłaniania zwrotnego glukozy. Dapagliflozyna, hamując aktywność SGLT2, zmniejsza zwrotne wchłanianie glukozy w nerkach. W swoich badaniach, Tang i wsp. (2017) potwierdzili wpływ dapagliflozyny na hamowanie rozwoju stłuszczenia wątroby. Poziomy białek NF- κ Bp65, oksydaz NADPH: Nox4 i Nox2 wątroby oraz RFT były zwiększone u myszy nietraktowanych dapagliflozyną. Postępujący proces zapalny przyczynia się do rozwoju nefropatii cukrzycowej, a działanie dapagliflozyny zmniejszyło stres oksydacyjny. Za jej efekt terapeutyczny można uznać również spowalnianie postępu stwardnienia kłębków nerkowych poprzez zmniejszenie stanów zapalnych tkanek i stresu oksydacyjnego dzięki aktywności hamującej NF- κ B [37].

4. Leki stosowane w leczeniu nadciśnienia tętniczego hamujące NF- κ B

4.1. Peryndopryl

Jest lekiem hipotensyjnym z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny (I-ACE). Jest to prolek, którego aktywną postacią jest peryndoprylat. Hamuje powstawanie angiotensyny II, przez co ogranicza jej działanie kurczące mięśnie gładkie tętniczek, zmniejsza opór obwodowy oraz zwiększa pojemność minutową serca. Przez zahamowanie ujemnego sprzężenia zwrotnego między angiotensyną II, a sekrecją reniny zwiększa aktywność reninową osocza i zmniejsza wydzielanie aldosteronu.

4.2. Losartan

Jest to swoisty, wybiórczy antagonist receptoru AT₁ angiotensyny II. Prolek jest metabolizowany w wątrobie do czynnej karboksypochodnej, która charakteryzuje się dłuższym t_{1/2} i wywiera antagonizujący efekt w stosunku do receptorów AT₁. Powoduje zwiększenie stężenia reniny i angiotensyny II w osoczu oraz zmniejszanie stężenia aldosteronu.

4.3. Fozynopryl

To organiczny związek z grupy fosfinianów, należących do I-ACE. Stosowany jest głównie w terapii nadciśnienia tętniczego. Stanowi prolek, którego aktywną formą jest fozynoprylat.

Trzy wymienione powyżej leki stosowane m.in. w farmakoterapii nadciśnienia tętniczego, leczeniu skojarzonym objawowej niewydolności serca oraz stabilnej choroby wieńcowej, zostały przebadane w modelu *in vitro* na komórkach raka wątrobowo-komórkowego typu HCC. Układ renina-angiotensyna (RAS) przyczynia się do rozwoju różnych typów nowotworów złośliwych. Badanie miało na celu określenie wpływu hamowania RAS za pomocą perindoprylu (w dawce 1 mg/kg m.c.), fozynoprylu (2 mg/kg m.c.) lub losartanu (10 mg/kg m.c.) na HCC w porównaniu z sorafenibem (30 mg/kg m.c.). Inhibitory RAS spowodowały poprawę funkcji wątroby i jej obrazu histologicznego. Efekty te udało się uzyskać dzięki hamowaniu fosforylacji NF- κ Bp65 w Ser536 oraz I κ B. W związku z tym poziomy ekspresji mRNA cytokiny D1 uległy znacznemu obniżeniu. Ponadto obniżony został poziom TNF- α indukowany przez NF- κ B, prowadzący do obniżenia transkryptów MMP-2 i czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF). Poprzednie raporty potwierdzają, że sorafenib również zmniejszał

ekspresję p50/p65 podjednostek NF- κ B i hamował wzrost guza poprzez inhibicję aktywacji NF- κ B [38]. Aktywność prozapalna angiotensyny II zależy od rekrutacji kompleksu IKK, prowadzącej do fosforylacji p65 reszty Ser536. Co więcej, leczenie angiotensyną II prowadzi do indukowanej fosforylacją degradacji inhibitora α NF- κ B, zwiększa translokację NF- κ B p65 oraz wiązanie do DNA. Badania te dostarczyły dowodów na zaangażowanie NF- κ B w przeciwnowotworowy mechanizm działania inhibitorów RAS. Wyniki te sugerują, że ACE-I mogą być obiecującymi kandydatami w dalszych próbach klinicznych podczas leczenia HCC [39].

5. Fenofibrat

Tsai i wsp. (2014) udowodnili, że fenofibrat wpływa korzystnie na leczenie zespołu metabolicznego nowotworu jamy ustnej. Podawany *in vitro* w dawce 50 μ M zahamowywał ekspresję MMP 1,2,7,9, migrację, zmniejszał ekspresję jądrowego NF- κ Bp65 i p50, oraz wiązanie do DNA. Wskazuje to na odmienny mechanizm działania przeciwnowotworowego, gdyż wspomniane efekty są AMPK-zależne, a nie PPAR- α -zależne. Fenofibrat aktywuje AMPK, co hamuje IKK, więc nie następuje fosforylacja I κ B, ani uwolnienie NF- κ B. Po raz pierwszy udowodniono mechanizm działania fenofibratu potwierdzający inhibicję inwazyjności i metastazy poprzez działanie na szlaki AMPK i NF- κ B. Skutkiem aktywacji AMPK było hamowanie PPAR- α w komórkach wątrobowych oraz aktywacja NF- κ B. Badania te dostarczają molekularnego uzasadnienia mechanizmu działania fenofibratu i potencjalnego działania przeciwnowotworowego [40].

Podsumowanie

Przez ostatnie trzy dekady od odkrycia NF- κ B, jesteśmy świadkami postępu w zrozumieniu skomplikowanych sieci sygnalizacyjnych oraz licznych funkcji szlaku, co wskazuje potencjalnie bezpieczniejsze alternatywy terapeutycznego hamowania NF- κ B. Hamowanie określonych elementów tego szlaku sygnalizacyjnego należy do najbardziej obiecujących strategii terapeutycznych, szczególnie w odniesieniu do profilaktyki chorób nowotworowych i układu krążenia. Choć pozostaje wiele do wyjaśnienia, dotychczasowe wyniki badań, uzasadniają kontynuację tego kierunku badań [41]. Opracowywanie nowych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na NF- κ B wymaga jednak pełnego zrozumienia

jego roli w zarówno procesach fizjologicznych, jak i patologicznych. Konstytutywna aktywacja dimerów NF- κ B jest istotnym elementem procesów związanych z rozwojem nowotworów, poprzez m.in. zwiększenie proliferacji komórek, hamowanie apoptozy, metastazę komórek nowotworowych i angiogenezę. Zaburzenia w mechanizmach regulacyjnych, które kontrolują specyficzność i zakres odpowiedzi z udziałem NF- κ B są przyczyną powstawania i rozwoju szeregu chorób np. autoimmunologicznych [42]. Z kolei całkowite zahamowanie aktywności NF- κ B może prowadzić do braku odporności immunologicznej. Z tego powodu konieczne jest zbadanie różnych dróg aktywacji NF- κ B, w różnych typach komórek oraz określenie ich roli w powstawaniu i rozwoju chorób tak, aby w każdym przypadku można było ustalić najbardziej korzystną strategię leczenia [43].

Podziękowania / Acknowledgments

Dziękujemy Pani Profesor Wandzie Baer-Dubowskiej za krytyczne uwagi dotyczące manuskryptu.

Źródło finansowania / Source of funding

Praca powstała podczas realizacji projektu 2016/21/B/NZ7/01758 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. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986;46:705-16.
2. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*. 1999;18: 6853-66.
3. Marok, R, Winyard PG, Coumbe A, et al. Activation of the Transcription Factor Nuclear Factor- κ B in Human Inflamed Synovial Tissue. *Arthritis Rheum*. 1996;39:583-91.
4. Han Z, Boyle DL, Manning AM, et al. AP-1 and NF- κ B Regulation in Rheumatoid Arthritis and Murine Collagen-Induced Arthritis. *Autoimmunity*. 1998;28:197-208.
5. Ellis RD, Goodlad JR, Limb GA, et al. Activation of Nuclear Factor kappa B in Crohn's Disease. *Inflammation Res*. 1998;47:440-5.
6. Burgos P, Metz C, Bull P, et al. Increased Expression of c-rel, from the NF- κ B/Rel Family, in T cells from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol*. 2000;27:116-27.
7. Panwalkar A, Verstovsek S, Giles F. Nuclear factor-kappaB modulation as a therapeutic approach in hematologic malignancies. *Cancer*. 2004;100:1578-89.
8. Schon M, Wienrich BG, Kneitz S, et al. KINK-1, a novel small-molecule inhibitor of IKKbeta, and the susceptibility of melanoma cells to antitumoral treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:862-75.
9. Shishodia S, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB activation mediates cellular transformation, proliferation, invasion angiogenesis and metastasis of cancer. *Cancer Treat Res*. 2004;119:139-73.
10. Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006;25:6680-84.
11. Felicity D, Herrington I, Ruaidhrí J, et al. Modulation of NF- κ B Signaling as a Therapeutic Target in Autoimmunity. *J Biomol Screen*. 2016;21(3):223-42.
12. Lee CH, Jeon YT, Kim SH, et al. NF- κ B as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors*. 2007;29:19-35.
13. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1:34.
14. Sun SC. Non-Canonical NF- κ B Signaling Pathway. *Cell Res*. 2011;21:71-85.
15. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, et al. Inhibiting NF- κ B Activation by Small Molecules As a Therapeutic Strategy. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799:775-87.
16. Herndon TM, Deisseroth A, Kaminskas E, et al. U.S. Food and Drug Administration Approval: Carfilzomib for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res*. 2013;19:4559-63.
17. Moore RA, Derry S, Phillips CJ, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), cyclooxygenase-2 selective inhibitors (coxibs) and gastrointestinal harm: review of clinical trials and clinical practice. *BMC Musculoskelet Disord*. 2006;7:79.
18. Woron J, Wordliczek J, Dobrogowski J. Porównanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ). *Medycyna po Dyplomie*. 2011;6: 55-63.
19. Rainsford KD. Current status of the therapeutic uses and actions of the preferential cyclooxygenase-2 NSAID, nimesulide. *Inflammopharmacology*. 2006;14:120-37.

20. Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB. The Anti-Inflammatory Agents Aspirin and Salicylate Inhibit the Activity of I κ B Kinase- β . *Nature*. 1998;396:77-80.
21. Korzeniowska K, Jankowski J, Jablecka A. Niesteroidowe leki przeciwzapalne. *Farm Wsp*. 2010;3:192-7.
22. Gaskell H, Derry S, Wiffen PJ, et al. Single dose oral ketoprofen or dexketoprofen for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;5:CD007355.
23. Dovizio M, Bruno A, Tacconelli S, et al. Mode of action of aspirin as a chemopreventive agent. *Recent Results Cancer Res*. 2013;191:39-65.
24. Shi C, Zhang N, Feng Y, et al. Aspirin Inhibits IKK- β -mediated Prostate Cancer Cell Invasion by Targeting Matrix Metalloproteinase-9 and Urokinase-Type Plasminogen Activator. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41:1313-24.
25. Damnjanovic I, Najman S, Stojanovic S, et al. Crosstalk between possible cytostatic and antiinflammatory potential of ketoprofen in the treatment of culture of colon and cervix cancer cell lines. *Bratisl Lek Listy*. 2015;116:227-32.
26. Gugliandolo E, Fusco R, D'Amico R, et al. Anti-inflammatory effect of ATB-352, a H₂S-releasing ketoprofen derivative, on lipopolysaccharide-induced periodontitis in rats. *Pharmacological Research*. 2018;132:220-31.
27. Ouyang N, Ji P, Williams JL. A novel NSAID derivative, phospho-ibuprofen, prevents AOM-induced colon cancer in rats. *Int J Oncol*. 2013;42(2):643-50.
28. Dauletbaev N, Lam J, Eklove D, et al. Ibuprofen Modulates NF- κ B Activity but Not IL-8 Production in Cystic Fibrosis Respiratory Epithelial Cells. *Respiration*. 2010;79(3):234-42.
29. Barcelos RP, Bresciani G, Cuevas MJ, et al. Diclofenac pretreatment modulates exercise-induced inflammation in skeletal muscle of rats through the TLR4/NF- κ B pathway. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2017;42:757-64.
30. Liu JF, Shao-Wei Z, Jamieson G, et al. The effects of a COX-2 inhibitor meloxicam on squamous cell carcinoma of the esophagus in vivo. *Drew Bratisl Lek Listy*. 2015;116:227-32.
31. Attur M, Dave M, Abramson SB, et al. Activation of diverse eicosanoid pathways in osteoarthritic cartilage: a lipidomic and genomic analysis. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2012;70:99-108.
32. Cai D, Frantz JD, NE Tawa Jr, et al. IKK β /NF- κ B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell*. 2004;119:285-98.
33. Vedin I, Cederholm T, Freund-Levi Y, et al. Effects of DHA-rich n-3 fatty acid supplementation on gene expression in blood mononuclear leukocytes: the OmegaAD study. *PLoS One*. 2012;7:e35425.
34. Goldfine AB, Fonseca V, Jablonski KA, et al. The effects of salsalate on glycemic control in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2010;152:346-57.
35. Donovan JM, Zimmer M, Offman E, et al. Novel NF- κ B Inhibitor, Edasalonexent (CAT-1004), in Development as a Disease-Modifying Treatment for Patients With Duchenne Muscular Dystrophy: Phase 1 Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics in Adult Subjects. *J Clin Pharmacol*. 2017;57:627-39.
36. Saengboonmee C, Seubwai W, Cha'on U, et al. Metformin Exerts Antiproliferative and Anti-metastatic Effects Against Cholangiocarcinoma Cells by Targeting STAT3 and NF- κ B. *Anticancer Res*. 2017;37:115-23.
37. Tang L, Wu Y, Tian M, et al. Dapagliflozin slows the progression of the renal and liver fibrosis associated with type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2017;313:563-76.
38. Park GB, Ko HS, Kim D. Sorafenib controls the epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells via EGF and the CD44-HA signaling pathway in a celltype-dependent manner. *Mol Med Rep*. 2017;16:1826-36.
39. Sameh S, Amr AA, Mahmoudb C, et al. Perindopril, fosinopril and losartan inhibited the progression of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in mice via the inactivation of nuclear transcription factor kappa-B. *Toxicology Letters*. 2018;295:32-40.
40. Tsai SC, Tsai MH, Chiu CF, et al. AMPK-dependent signaling modulates the suppression of invasion and migration by fenofibrate in CAL 27 oral cancer cells through NF- κ B pathway. *J Pineal Res*. 2016;60:277-90.
41. Begalli F, Bennett J, Capece D, et al. Unlocking the NF- κ B Conundrum: Embracing Complexity to Achieve Specificity. *Biomedicines*. 2017;5:50.
42. Czyż M. Specyficzność i selektywność działania czynnika transkrypcyjnego NF κ B. *Postępy Biochemii*. 2005;51:60-8.
43. Wisnik E, Koter-Michalak M. Komórkowy szlak sygnalizacyjny zależny od jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i jego zaburzenia w wybranych chorobach nowotworowych. *Postępy Biologii Komórki*. 2015;42:559-72.