

Barbara RUSINEK
Krystyna OBTUŁOWICZ
Ewa CZARNOBILSKA

Zakład Alergologii Klinicznej UJCM,
Kraków

Receptor glikokortykosteroidowy i molekularny mechanizm działania glikokortykosteroidów w astmie oskrzelowej

Słowa kluczowe:

- receptor
- glikokortykosteroidy
- astma oskrzelowa

Key words:

- receptor
- glucocorticosteroids
- bronchial asthma

Glikokortykosteroidy (GKS) są najefektywniejszymi lekami przeciwzapalnymi w terapii astmy oskrzelowej. W pracy przedstawiono aktualną wiedzę dotyczącą mechanizmów działania GKS. Zgodnie z klasycznym modelem działania, zwanym genomowym, GKS wiążą się z receptorami wewnątrzkomórkowymi i bezpośrednio lub pośrednio regulują transkrypcję genów i syntezę białek odpowiedzialnych za proces zapalny. Mechanizm genomowy zachodzi poprzez transrepresję lub transaktywację. GKS hamują aktywność licznych genów prozapalnych (transrepresja) aktywowanych nadmiernie w drogach oddechowych w astmie, poprzez wpływ na acetylację histonów, dzięki wiązaniu receptora GKS z koaktywatorami transkrypcji o wewnętrznej aktywności acetylazy histonów (HAT) oraz przez rekrutację deacetylazy histonów (HDAC). Ponadto aktywowane receptory GKS wchodzą w interakcje z innymi prozapalnymi czynnikami transkrypcyjnymi i hamują ich działanie. Homodimery receptorów GKS wiążąc się z sekwencjami GRE (glucocorticoid response elements) w regionie promotorowym steroidowrażliwych genów, aktywują ich transkrypcję (transaktywacja), czego pozytywnym efektem jest produkcja białek przeciwzapalnych. Transaktywacja jest jednak również mechanizmem odpowiedzialnym za efekty uboczne terapii GKS. GKS wykazują także efekty postgenomowe poprzez wpływ na stabilność mRNA niektórych białek prozapalnych. Ponadto GKS wykazują niegenomowe efekty działania ujawniające się szybko, w ciągu kilku sekund lub minut od podania leku. Mechanizmy te obejmują wpływ na system wtórnych przekaźników i aktywację różnych ścieżek przekazywania sygnału do wnętrza komórki i zachodzą za pośrednictwem receptorów jądrowych lub błonowych.

Glucocorticosteroid's receptor and molecular mechanism of glucocorticosteroids action in bronchial asthma

Corticosteroids are the most effective anti-inflammatory therapy for asthma. The review describes current advances in the knowledge on the mechanisms of glucocorticoids (GCS) action. According to the classic genomic model corticosteroids bind to intracellular receptors and directly or indirectly regulate gene transcription and synthesis of proteins responsible for inflammatory process. Genomic effects are mediated by transrepression or transactivation. Corticosteroids suppress the multiple inflammatory genes (transrepression) that are activated in asthmatic airways mainly by reversing histone acetylation of activated inflammatory genes through binding of glucocorticoid receptors to coactivators which have intrinsic HAT activity, and recruitment of histone deacetylase (HDAC). Activated glucocorticoid receptors also interact with pro-inflammatory transcription factors to inhibit their actions. Glucocorticoid receptors homodimers bind to glucocorticoid response elements (GRE) in the promoter region of steroid-sensitive genes to activate their transcription, resulting in secretion of anti-inflammatory proteins (transactivation). Transactivation is largely responsible for GCS side effects. Corticosteroids have also post-genomic effects by reducing the stability of mRNA of several inflammatory proteins. Glucocorticoid also exerts effects characterized as nongenomic which occur within seconds or minutes of drug administration. The mechanisms of action of nongenomic effects involve the production of second-messenger molecules and activation of signal transduction pathways, either by the nuclear glucocorticoid receptor or by a membrane glucocorticoid receptor.

Adres do korespondencji:

Zakład Alergologii Klinicznej i Środowiskowej
Collegium Medicum Uniwersytet Jagielloński
31-531 Kraków, ul. Śniadeckich 10
Tel./Fax: 12 423 11 22

Glikokortykosteroidy (GKS) są niezbędnymi do życia hormonami, które uczestniczą w istotnych procesach fizjologicznych ustroju, takich jak regulacja metabolizmu (glukozy, białek, lipidów), rozwój i różnicowanie komórek oraz ich zaprogramowana śmierć.

Są również głównymi regulatorami procesów immunologicznych i zapalnych ustroju, w których pełnią rolę hamującą, a ich pochodne są najważniejszymi lekami o działaniu przeciwzapalnym [1]. W leczeniu astmy oskrzelowej, choroby o podłożu zapalnym, GKS wziewne są podstawowymi lekami w terapii przewlekłej, kontrolującymi przebieg choroby [2], a także modyfikują działanie receptora beta2 adrenergicznego. Według klasycznej teorii mechanizm działania GKS jest związany z bezpośrednim lub pośrednim wpływem na ekspresję genów kodujących mediatory procesu zapalnego (mechanizm genomowy – jądrowy i cytoplazmatyczny za pośrednictwem swobodnego receptora). Ostatnio coraz więcej mówi się o niegenomowych mechanizmach ich działania, ujawniających się krótko po podaniu i zależnych od dawki leku [3].

Receptor glikokortykosteroidowy

Większość efektów działania GKS ujawnia się poprzez interakcję naturalnego hormonu lub leku z receptorem glikokortykosteroidowym (GKSR). GKSR należy do nadrodziny receptorów jądrowych i jest białkiem zbudowanym z łańcucha polipeptydowego o 777 aminokwasach. Występuje we wszystkich komórkach jądrowych organizmu, a w szczególności dużej ilości w nabłonku oskrzeli i śródbłonku naczyń płucnych [4]. W obrębie receptora wyróżnia się kilka domen:

1. N końcowa domena aktywacyjna (AF1) – wpływająca na aktywację czynności receptora i oddziaływanie z innymi czynnikami transkrypcyjnymi.

2. Centralna domena wiążąca DNA (DBD – *DNA binding domain*) – zawierająca tzw. „palce cynkowe” (kompleksy reszt cysteinowych z cynkiem) umożliwiające wiązanie GKSR z DNA. Tutaj też znajduje się sekwencja 5 aminokwasów zwana pętlą dimeryzacyjną (D-loop), która decyduje o możliwości tworzenia dime-rów przez aktywny GKSR.

3. Region zawiasowy warunkujący ujawnienie się sygnału translokacji receptora do jądra (domena NLS – *nuclear localisation signal*). W tym miejscu dochodzi do zmiany konfiguracji przestrzennej receptora po jego związaniu z cząsteczką hormonu czy leku.

4. Domena wiążąca ligand (LBD – *ligand binding domain*), którym może być naturalny hormon, lek oraz białko opiekuńcze hsp.

5. C końcowa domena aktywacyjna (AF2) – umożliwia wiązanie z białkami koaktywatorowymi.

Receptor GKSR występuje w trzech lokalizacjach: cytoplazmatycznej, jądrowej i błonowej. W cytoplazmie GKSR występuje jako monomer, co umożliwiło mu bezpośrednie oddziaływanie typu białko-białko z innymi pozajądrowymi białkami regulacyjnymi i w sposób pośredni modyfikację czynności genów. Nieaktywny GKSR w cytoplazmie połączony jest z konglomeratem białek dezaktywujących receptor: białkami opiekuńczymi hsp90 (heat shock protein – białko szoku cieplnego o ciężarze cząsteczkowym 90 kDa), hsp70, hsp56 a także inhibitorami białkowymi immunofiliną p59 i fosfoproteiną p23. Połączenie to zapewnia konfigurację receptora o dużym powinowactwie do GKS, zatrzymanie receptora w cytoplazmie i zapobiega jego wiązaniu z DNA. Przyłączenie agonisty indukuje uwolnienie białka hsp 90 z następową zmianą konformacyjną prowadzącą do translokacji kompleksu do jądra komórkowego, gdzie łączy się on w pary (dimeryzacja – homodimery) i wiąże za pomocą palcy cynkowych ze spiralą DNA wpływając na proces transkrypcji genów (patrz niżej). W jądrze GKSR występuje wyłącznie w postaci dimeru. W 2004 roku wykryto receptory GKSR w błonie komórkowej, przez które GKS działają w mechanizmie niegenomowym, poprzez szybkie zmiany w czynności różnych ścieżek sygnałowych [5].

Receptory GKS kodowane są przez pojedynczy gen położony w regionie 5q31p. Obróbka posttranskrypcyjna odpowiedzialna jest za występowanie 2 izoform receptora- alfa i beta. Izoforma alfa jest aktywną formą receptora. Izoforma beta, krótsza od niej o 35 aminokwasów i o zmienionej sekwencji aminokwasów domeny wiążącej ligand nie ma zdolności łączenia się z GKS. Ma jednak zachowaną zdolność wiązania z DNA (bez możliwości aktywowania genów), przez co blokuje dostęp izoformy alfa do DNA. Tworząc heterodimer z aktywnym monomerem alfa hamuje jego aktywność. Klinicznie może się to przejawiać jako wtórna oporność na GKS. Proces zapalny może nasilać ekspresję izo-

formy beta. Wykazano, że cytokiny prozapalne IL-1, IL-2, IL-4, IL-13, TNF alfa szczególnie aktywują mechanizmy alternatywnego składania.

Czynniki transkrypcyjne w regulacji procesów zapalnych

W przewlekłej chorobie zapalnej jaką jest astma oskrzelowa dochodzi do nacieku i aktywacji wielu komórek zapalnych, uwalniających mediatory zapalne, które wchodzi w interakcje i aktywują komórki strukturalne w miejscu zapalenia. Zwiększona ekspresja prozapalnych protein (cytokiny, chemokiny, enzymy, czynniki chemotaktyczne, receptory) jest regulowana poziomem transkrypcji genów, poprzez aktywację prozapalnych czynników transkrypcyjnych (takich jak NFkB, AP-1), pełniących główną rolę we wzmacnianiu i podtrzymaniu procesu zapalnego [4]. Czynniki transkrypcyjne są to międzykomórkowe cząsteczki sygnałowe pośredniczące w przekazywaniu (transdukcji) informacji docierającej do komórki z zewnątrz na genotyp. Cytokiny i czynniki wzrostowe wywierają swoje działanie poprzez wiązanie się z receptorami na komórkach docelowych ze zwiększeniem międzykomórkowej produkcji różnych kinaz białkowych oraz fosforylacji czynników transkrypcyjnych. Hormony, witaminy mogą aktywować czynniki transkrypcyjne bezpośrednio. Czynniki transkrypcyjne wiążą się z sekwencjami regulatorowymi (motywami, elementami) zwykle w rejonie promotora na genach docelowych, czego wynikiem jest albo promocja (transaktywacja) albo supresja (transrepresja) genu, produkcja mRNA, a następnie odpowiednich cytokin i białek. Czynniki transkrypcyjne to cztery klasy białek zawierające specjalne struktury (helisy połączone pętlą, suwak leucynowy, palce cynkowe, helisa skręt helisa) umożliwiające oddziaływanie ze swoistymi sekwencjami w DNA. Ich cechą jest dimeryczna struktura (połączenie dwóch białek) przy czym tylko jedna podjednostka ma właściwości aktywacji transkrypcji. Białek o charakterze czynników transkrypcyjnych w komórkach są setki, wchodzi one w interakcje z DNA komórki oraz pomiędzy sobą (*cross talk*). Dla maksymalnej ekspresji genu konieczna czasem jest interakcja kilku czynników transkrypcyjnych. W chorobach alergicznych obserwuje się nadekspresję pewnych czynników transkrypcyjnych:

- W regulacji odpowiedzi immunologicznej związanej z astmą oskrzelową biorą udział NFkB (*nuclear factor k B*), AP-1 (*activator protein-1*). Aktywują one ekspresję genów kodujących białka odpowiedzialne za procesy zapalne, genów antyapoptotycznych oraz regulujących proliferację komórki. NFkB jest heterodimerem składającym się z dwóch podjednostek p65 (aktywnej transkrypcyjnie) oraz p50. Białko ochronne IkB utrzymuje NFkB w formie nieaktywnej, po jego fosforylacji przez kinazę IKK i odłączeniu od kompleksu obie podjednostki przemiaszczają się do jądra i łączą w aktywny heterodimer;

- W różnicowaniu komórek prekursorowych Th0 w Th2 biorą udział czynniki transkrypcyjne STAT-6 (*Signal transducer and activator of transcription*), GATA 3;

- W produkcji IL-4 przez Th2 bierze udział NFATc (*nuclear factor of activated T cells*);

- W *switch class* w limfocytach B i produkcji IgE bierze udział STAT 6.

GKSR również jest czynnikiem transkrypcyjnym. Posiada „palce cynkowe” do bezpośrednich interakcji z DNA, wpływa na inne w/w czynniki transkrypcyjne oraz białka koaktywatorowe w oddziaływaniach typu białko-białko (*cross-talk*) i w ten sposób wykazuje działanie przeciwzapalne.

Na dostępność miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych wpływa struktura (upakowanie) chromatyny. Chromatyna składa się z nukleosomów, utworzonych przez białkowy rdzeń (osiem histonów rdzeniowych – oktamer histonowy), na które nawinięta jest dwukrotnie nić DNA. Im bardziej rozluźniona jest chromatyna, tym więcej jest wolnych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych, do DNA może przyłączyć się polimeraza DNA co warunkuje i rozpoczyna transkrypcję. Acetylacja reszt lizynowych histonów przy udziale acetylazy histonów (HAT histon acetyltransferase) ma kluczowe znaczenie dla rozluźnienia chromatyny. Aktyw-

Tabela 1
Molekularny mechanizm działania GKS.
Molecular mechanism of GCS action.

I. GENOMOWE
<p>Transaktywacja - Pobudzenie transkrypcji genów przez bezpośredni wpływ na transkrypcję (wiązanie dimeru GKS z positive GRE)</p> <ul style="list-style-type: none"> • IκB (inhibitor κB), lipokortyny 1, receptora adrenergicznego B2, MKP-1 (fosfataza kinaz białkowych aktywowanych miogenami), GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper protein), SLPI (secretory lymphocyte protease inhibitor – niskocząsteczkowy inhibitor protein), CC10 (białko komórek Klara), antagonistą receptora IL-1. • Większość niepożądanych efektów metabolicznych działania GKS związanych jest z tym mechanizmem.
<p>Transrepresja - Zahamowanie transkrypcji genów cytokin IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-13, IL-16, IL-17, IL-18, TNFα, GM-CSF, chemokin RANTES, MIP1α, eotaksyny, enzymów INOS, COX2, PLA2, receptorów neurokininowego, bradykininowego, innych białek endoteliny 1.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bezpośrednia – przez bezpośredni wpływ na transkrypcję (wiązanie dimeru GKS z negative GRE). <p>Jest to również mechanizm występowania działań niepożądanych: osteoporozy i supresji osi podwzgórze-przysadka-nadnercza przez zahamowanie transkrypcji genów dla osteokalcyny, kortykoliberyny, proopiomelanokortyny.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pośrednia - najważniejszy mechanizm działania przeciwzapalnego GKS. <ol style="list-style-type: none"> 1. Pośredni wpływ na ekspresję genów przez cross-talk (bezpośrednie oddziaływanie typu białko-białko) aktywnego monomeru GKS z innymi czynnikami transkrypcyjnymi NFκB, AP-1, CREB (hamując ich wpływ na ekspresję genów prozapalnych). 2. Pośredni wpływ na ekspresję genów przez wpływ na remodeling chromatyny. Aktywne monomery GKS hamują aktywność HAT a zwiększają rekrutację HDAC, hamując transkrypcję genów prozapalnych. 3. Posttranskrypcyjna regulacja ekspresji genów przez GKS poprzez wpływ na transport i metabolizm mRNA oraz translację
II. NIE GENOMOWE – szybkie efekty działania GKS
<ul style="list-style-type: none"> • modyfikacja przepuszczalności błon komórkowych i pomp jonowych • potencjalizowanie działania noradrenaliny • wpływ na kaskadę kinaz • oddziaływanie z GPCR (G protein coupled receptors - receptory związane z białkami G)

ność HAT posiadają koaktywatory transkrypcji takie jak CBP (*CREB binding protein*), p300 (gdy są aktywowane przez związanie np. czynników transkrypcyjnych NFκB i AP-1) oraz czynniki związane z p300/CBP (*PCAF- p300/CBP-associated factor*). Aktywny GKS interferuje z aktywacją CBP. Blokuje miejsca wiązania dla w/w czynników transkrypcyjnych na CBP i blokuje jej aktywność HAT. Za reakcję deacetylacji histonów odpowiedzialna jest deacetylaza histonów (HDAC – *histone deacetylase*), która ma jedenaście izoenzymów. Deacetylazy histonów współdziałają z korepresorami transkrypcji (np. korepresor receptora jądrowego), tworząc z nimi kompleksy odpowiedzialne za hamowanie ekspresji genów.

Mechanizmy działania GKS

Mechanizmy działania GKS w komórce możemy podzielić na genomowe przez bezpośredni lub pośredni wpływ na transkrypcję i translację genów kodujących mediatory procesu zapalnego, w których uczestniczą GKS na terenie cytoplazmy i jądra oraz mechanizmy niegenomowe, w których odgrywają rolę receptory cytoplazmatyczne lub błonowe, a także sygnał może być przekazywany bez pośrednictwa GKS (tabela 1). Głównym efektem sterydoterapii jest wyciszenie licznych genów prozapalnych aktywowanych w toku przewlekłego zapalenia. W wyższych dawkach ujawniają się efekty dodatkowe w postaci nasilenia syntezy białek przeciwzapalnych i efekty niegenomowe [6].

Genomowy mechanizm działania GKS

Bezpośrednie oddziaływania GKS z DNA

Glikokortykosteroid po wnikięciu do komórki łączy się ze swoim nieaktywnym receptorem połączonym z białkami opiekuńczymi. Związanie agonisty prowadzi do aktywacji receptora, uwolnienia białka hsp90 i zmiany konformacyjnej prowadzącej do translokacji kompleksu do jądra komórkowego, gdzie GKS dimeryzuje. Podczas aktywacji odsłonięte zostają domeny wiążące DNA zawierające palce cynkowe, za pomocą których homodimer przylacza się do sekwencji regulatorowych GRE w części promotora genów docelowych. Sekwencje GRE (*glucocorticoid response element* – elementy oddziałujące z GKS) określane są jako pozytywne (*positive GRE*), jeśli przyłączenie kompleksu GKS-GKS prowadzi do aktywacji genu, a jako negatywne (*negative GRE*) gdy efektem jest hamowanie syntezy białek. Związanie z DNA indukuje zmiany konformacyjne w obrębie GKS, które są sygnałem dla rekrutacji koaktywatorów transkrypcji o aktywności wewnętrznej acetylazy histonów HAT (CBP, pCAF). Dochodzi do

rozłączania nukleosomów, rozplątywania nici DNA, umożliwiając przyłączenie polimerazy II RNA i białka wiążącego TATA (TBP – *TATA box binding protein*), co warunkuje rozpoczęcie transkrypcji [6]. Pozytywny efekt związany z pobudzeniem transkrypcji (transaktywacją) przez GKS w astmie oskrzelowej to transkrypcja białek o działaniu przeciwzapalnym (tabela 1). Białko IκB (inhibitor NFκB) wiąże się z aktywowanym NFκB w jądrze komórkowym oraz indukuje oddzielenie NFκB od miejsca wiązania na genach docelowych co hamuje transkrypcję zależnych od NFκB genów. Lipokortyna 1 jest inhibitorem fosfolipazy A2 – enzymu uwalniającego kwas arachidonowy z fosfolipidów co zapoczątkowuje bieg kaskady kwasu arachidonowego. GKS dzięki lipokortynie zmniejszają więc wytwarzanie lipidowych mediatorów zapalenia – leukotrienów i prostanoidów.

Receptor B2 adrenergiczny (B2AR) ulega degradacji w toku pobudzenia przez agonistów (*down regulation*) a GKS zapobiegają temu zjawisku, stąd strategia łączenia GKS z beta2 mimetykami w astmie oskrzelowej. Podczas długotrwałego stosowania beta2-mimetyków powstaje zjawisko tolerancji (tachyfilaksji) – w miarę stosowania leku zmniejsza się jego efekt leczniczy. Od receptora beta2 odłącza się na krótki okres czasu białko regulacyjne Gs na skutek działania kinazy białka Gs. Bez tego białka, którego podjednostka alfa aktywuje cyklazę adenylową, nie może dojść do rozkurczu oskrzeli. GKS hamują działanie kinazy białka Gs i w ten sposób zapobiegają rozwojowi tolerancji na beta 2 mimetyki. GKS wpływają na odbudowę B2AR oraz na transdukcję sygnału w jego obrębie korzystnie modyfikując jego sprzężanie z białkiem G (patrz niżej).

Białko GILZ (*glucocorticoid-induced leucine zipper protein*) działa przeciwzapalnie przez hamowanie NFκB i AP-1. Z mechanizmem transaktywacji przede wszystkim związana jest większość niepożądanych efektów metabolicznych terapii GKS. Hamujący efekt na transkrypcję za pośrednictwem negatywnego GRE nosi nazwę transrepresji bezpośredniej. W ten sposób GKS hamują transkrypcję genów dla osteokalcyny, kortykoliberyny oraz proopiomelanokortyny (prekursora ACTH, lipotropiny, melanotropiny, β-endorfiny), czego kliniczną manifestacją są zmniejszenie gęstości mineralnej kości i zahamowanie osi podwzgórze – przysadka - nadnercza. Dimeryzacja receptora i jego oddziaływanie z DNA jest „preferowane” przy niskich stężeniach ligandu, co odpowiada fizjologicznemu podstawowemu wydzielaniu kortyzolu. Kluczowe znaczenie dla tego procesu ma zestaw aminokwasów tworzących „pętlę dimeryzacyjną” (*D-loop*). W przypadku punkto-

wej mutacji w jej obrębie obserwowano (przy zachowaniu efektów przeciwzapalnych) całkowitą utratę wpływu GKS na metabolizm tkankowy [7].

Pośrednia represja aktywności genów (transrepresja pośrednia) przy udziale GKSR

GKS wpływają hamująco na znacznie większą liczbę genów (cytokin, chemokin, enzymów, receptorów i innych białek) w sposób niezależny od bezpośredniego oddziaływania z DNA (tabela I). Aktywowany kompleks GKS-GKSR pozostaje w cytoplazmie w formie monomeru i wchodzi w interakcje (cross talk) z innymi pozajądrowymi czynnikami transkrypcyjnymi (NFκB, AP-1, CREB, STAT), białkami koaktywatorowymi, białkami szlaków sygnałowych kinaz, nie dopuszczając do ich oddziaływania na terenie jądra. Jest to główny mechanizm regulacji odpowiedzi immunologicznej i zapalnej ustroju. Wymaga on wyższych stężeń ligandu, co odpowiadałoby wyrzutowi kortyzolu w reakcji na stres. Substytutem takich stężeń jest najprawdopodobniej zwiększone powinowactwo receptorowe, które posiadają wszystkie stosowane w terapii sterydy wziewne.

GKSR jako monomer ulega fosforylacji przez kinazę fosforylującą N-terminalną część białka Jun (JNK – *Jun N-terminal kinase*), która być może jest niezbędna do osłabienia sygnału lokalizacji jądrowej [8].

GKS inaktywują NFκB przez bezpośrednią interakcję między aktywowanym GKSR a podjednostką p65 NFκB, a AP-1 przez wiązanie z podjednostką c-Jun. Dzięki temu dochodzi do redukcji ekspresji genów prozapalnych przez nie regulowanych np. iNOS (*inducible nitric oxide synthetase* – indukowalna syntaza tlenu azotu) zależnej od NFκB, czego widocznym rezultatem jest redukcja poziomu NO tlenu azotu w powietrzu wydechowym. Analogicznie interakcja GKSR z NFκB i AP-1, które są ważnymi czynnikami w ekspresji RANTES (cytokiny działającej chemotaktycznie na eozynofile), powoduje zmniejszenie napływu eozynofili w trakcie kortykoterapii.

Receptory GKSR w postaci aktywnych monomerów wpływają na proces przebudowy chromatyny. Hamują acetylazę histonów (HAT) bezpośrednio i pośrednio przez oddziaływania z NFκB oraz zwiększają aktywację deacetylazy histonów (HDAC), co powoduje zahamowanie transkrypcji genów prozapalnych (wyciszenie genów). HDAC oprócz histonów może deacetylować również czynniki transkrypcyjne np. GATA3, podjednostkę p65 NFκB i sprzyjać jej łączeniu z białkiem inhibitorowym IκB, co prowadzi do zmniejszenia ekspresji kontrolowanych przez te czynniki genów cytokin [9]. Polimorfizm w zakresie HDAC może wpływać na rozwój oporności na GKS. Kompleks HDAC jest niezwykle podatny na utlenianie. Aktywne rodniki tlenowe w trakcie stresu oksydacyjnego (np. związanego z paleniem papierosów) powodują zahamowanie funkcji i zmniejszenie ekspresji HDAC (degradacja w proteasomie). Prawdopodobnie dlatego u palących astmatyków przeciwzapalne działanie GKS jest wyraźnie mniejsze. Teofilina w małych dawkach chroni HDAC przed uszkodzeniem. Powoduje wzrost aktywności HDAC, może wspomóc działanie GKS i przywrócić wrażliwość na nie u chorych z wtórną opornością na GKS w ciężkiej astmie i u palących papierosy.

Potranskrypcyjna regulacja ekspresji genów

GKS poprzez wpływ na aktywność wewnątrzkomórkowych układów sygnalizacyjnych związanych z kaskadą fosforylacyjną zależną od kinaz serynowo/treoninowych, wpływają na transkrypcję i translację genów prozapalnych. GKS w tym mechanizmie destabilizują mRNA dla mediatorów prozapalnych zawierających sekwencje AURE (*AU-rich elements* – sekwencje bogate w adeninę i uracyl) [10]. Posiadają je m.in. IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα, GM-CSF, COX-2, eotaksyna. Za stabilizację mRNA dla cytokin prozapalnych odpowiada enzym p38MAP (*mitogen activated protein kinase* – kinaza białkowa aktywowana mitogenami). GKS wpływają na jego destabilizację poprzez aktywację fosfatazy 1 MAPK (MKP-1), naturalnego inhibitora p38MAP.

Niegenomowy mechanizm działania GKS

Rezultaty mechanizmów genomowych działania GKS wymagają czasu i pojawiają się najwcześniej po kilkudziesięciu minutach. Od dawna jednak obserwuje się przykłady działań GKS ujawniające się bardzo szybko, w ciągu minut lub sekund, czasem

jeszcze w trakcie podawania leku dożylnego w napadzie astmy. Te szybkie efekty działania GKS mają charakter heterogenny i występują również w komórkach bez jąder, więc nie są związane z ekspresją genów. W ostatnich latach odkrywano coraz to nowe ścieżki sygnałowe. Niegenomowe mechanizmy działania GKS obejmują wpływ na kanały jonowe i przepuszczalność błon komórkowych, wpływ na system wtórnych przekaźników oraz aktywację dróg różnych kinaz białkowych, a ujawniają się najczęściej przy dużych dawkach leków [10]. W niektórych przypadkach w efektach tych pośredniczy GKSR, a niektóre wydają się wynikać z wpływu na niektóre fizykochemiczne właściwości błony komórkowej bez pośrednictwa receptora. GKS jako wysoce lipofilne związki interferują z funkcją związanych z błoną cząsteczek takich jak kanały jonowe: wapniowe, sodowo-potasowe, chlorkowe oraz receptory. Rezultatem tych interferencji jest zmiana przepuszczalności i zachowanie ciągłości błon komórkowych. Megadawki GKS w ciągu kilku minut mogą zahamować degranulację neutrofilii. Bolus GKS (powyżej 250 mg/dobę w przeliczeniu na encorton) w leczeniu urazów rdzenia kręgowego, SM, czy anafilaksji zabezpiecza (prawdopodobnie w tym mechanizmie) przed wystąpieniem wczesnego obrzęku [10].

W mechanizmie niegenomowym GKS uruchamiają system wtórnych przekaźników (jony wapnia, cykliczne nukleotydy cAMP, cGMP, trójfosforan inozytolu IP3, diacyloglicerol DAG). Wzrost aktywności określonego wtórnego przekaźnika uruchamia zależną od niego kinazę (lub kaskadę kinaz), co zmienia bieg niektórych procesów komórkowych. Rolę w przekazywaniu sygnałów nietranskrypcyjnych odgrywają szlaki kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK- głównie Erk 1/2, i p38), Kinazy białkowej A (PKA) i C (PKC), kinaz tyrozynowych (np. Src) i lipidowych (kinaza trójfosforanu inozytolu - PI3K). GKS bezpośrednio lub za pośrednictwem receptorów błonowych mogą łączyć się z podjednostką α białka Gs aktywującego cyklazę adenylową, co uruchamia ścieżkę sygnałową Gs-cAMP-PKA, z następczą syntezą przeciwzapalnych endokannabinoidów. Sugerowano również możliwość interakcji z białkiem inhibitorowym Gi, które hamuje cyklazę adenylową. GKS w obrębie błony komórkowej mogą też wchodzić w interakcje z podjednostką Ca²⁺ + ATP azy. Aktywacja receptora błonowego przez duże dawki GKS, z indukcją IP3 jako wtórnego przekaźnika, wzmacnia aktywność śródbłonkowej syntazy tlenu azotu, co daje natychmiastową poprawę przepływu krwi w obszarze niedokrwienia oraz zmniejszenie reakcji zapalnej w naczyniach w zawałe mięśnia sercowego i udarze niedokrwienne mózgu – model zwierzęcy [3].

Uważa się, że niegenomowe mechanizmy stanowią pierwszy etap działania GKS, który wzmacnia genomowe efekty występujące w dalszej kolejności. Genomowe oddziaływanie GKS dostarczają natomiast białek, koniecznych do nietranskrypcyjnego przekazywania sygnału [10]. Oba mechanizmy działania uzupełniają się i potencjalizują. Ze zrozumienia molekularnych mechanizmów działania GKS wynikają próby wynalezienia cząsteczek GKS nowej generacji (GKS zdysocjowane), w których zostałyby zachowane korzystne przeciwzapalne efekty związane z transrepresją, a zablokowane mechanizmy bezpośredniego oddziaływania z DNA (transaktywacja i transrepresja bezpośrednia), co zredukowało by ryzyko systemowych efektów niepożądanych [11]. Wyjaśnienie molekularnych mechanizmów działania GKS dało też początek badaniom nad alternatywnymi lekami przeciwzapalnymi ingerującymi w różne ścieżki sygnałowe działania GKS, np. inhibitorami o niskiej masie cząsteczkowej IKK2 (*inhibitor of IκB kinase 2*), czy inhibitorami kinazy p38 MAP [12]. Wiele aspektów działania GKS wymaga jeszcze dalszych badań, jednakże ze względu na wielokierunkowość i wszechstronność działania GKS są prawdopodobnie będą w przyszłości lekami nie do zastąpienia.

Piśmiennictwo

1. Grzanka A. Genetyka astmy i molekularne podstawy działania leków stosowanych w astmie. [W:] Droszcz W. Astma, PZWL 2007; 33-93.
2. Global strategy for asthma management and prevention. Global Initiative for Asthma (Revised 2009) www.ginasthma.com
3. Grzanka A, Jarzab J. Niegenomowy mechanizm działania glikokortykosteroidów. *Pneumonol Alergol Pol* 2009; 77: 387-393.
4. Barnes PJ. Transcription factors and asthma *Eur Respir J* 1998; 12: 221-234.
5. Bartholome B, Spies CM et al. Membrane glucocorticoid receptors (mGKR)

are expressed in normal peripheral blood mononuclear cells and upregulated following in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J* 2004; 18: 70-80.

6. Barnes PJ. How corticosteroids control inflammation. Quintiles Prize Lecture 2005. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 245-254.

7. Lipworth BJ. Therapeutic implications of non-genomic glucocorticoid activity. *Lancet* 2000; 365: 87-89.

8. McMaster A, Ray DW. Modelling the glucocorticoid receptor and producing therapeutic agents with anti-inflammatory effects but reduced side-effects. *Exp Physiol* 2007; 92: 299-309.

9. Mróz RM, Norparlik J. Sygnalizacja zależna od histonów w farmakoterapii przewlekłej obturacyjnej choroby płuc. *Pneumonol Alergol Pol* 2007; 75: 375-382.

10. Stellato C. Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticosteroids. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1: 255-263.

11. Löwenberg M, Stahn C et al. Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids* 2008; 73: 1025-1029.

12. Barnes PJ. Corticosteroid effects on cell signaling. *Eur Respir J* 2006; 27: 413-427.