

Received: 2007.04.03
Accepted: 2007.07.16
Published: 2007.08.21

Wpływ takrolimusu na stres oksydacyjny i procesy wolnorodnikowe

The influence of tacrolimus on oxidative stress and free-radical processes

Anna Długosz, Dorota Średnicka, Jacek Boratyński

Katedra i Zakład Toksykologii Akademii Medycznej we Wrocławiu

Streszczenie

Stres oksydacyjny zaburza homeostazę prowadząc do nadmiernego wytwarzania reaktywnych form tlenu (RFT). Reakcje wolnorodnikowe ulegają nasileniu podczas transplantacji i są odpowiedzialne zarówno za uszkodzenie przeszczepu, jak i za powikłania sercowo-naczyniowe, będące jedną z głównych przyczyn śmierci chorych. Funkcja leków immunosupresyjnych w tym procesie jest przedmiotem badań. Prowadzone są poszukiwania leków, które obniżałyby poziom stresu oksydacyjnego.

Takrolimus (FK-506) jest powszechnie stosowany w terapii immunosupresyjnej. Ma on korzystniejszy od cyklosporyny profil sercowo-lipidowy. Ukazało się wiele doniesień o korzystnym działaniu takrolimusu na poziom stresu oksydacyjnego w organizmie. Zwłaszcza badania *in vitro* oraz na zwierzętach wskazują na właściwości antyoksydacyjne takrolimusu. Obserwowano spadek parametrów stresu oksydacyjnego, takich jak: stężenie dialdehydu malonowego (MDA), aktywność mieloperoksydazy (MPO), obecność nacieku neutrofilowego pod wpływem tego leku. W badaniach *in vitro*, na komórkach śródbłonna, takrolimus słabiej niż inne leki indukował stres oksydacyjny oraz jako jedyny nie zwiększał wytwarzania tlenu azotu (NO). Opisano także protekcyjny wpływ takrolimusu na odpowiedź zapalną wątroby u szczurów podczas uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego, na astrocyty kory mózgowej eksponowane na warunki stymulowanej *in vitro* ischemii oraz na tkanki w eksperymentalnym pourazowym uszkodzeniu rdzenia kręgowego u szczurów. Wyniki badań nie są tak jednoznaczne u pacjentów po przeszczepie, a nawet wskazują, iż wpływ takrolimusu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w nerkach może być przyczyną jego tkankowej toksyczności w tym narządzie.

Słowa kluczowe:

takrolimus • stres oksydacyjny • wolne rodniki

Summary

Oxidative stress causes disturbances in homeostasis leading to an excessive production of reactive oxygen species (ROS). Free-radical reactions undergo intensification during transplantation and are responsible for both damage to the graft and cardiovascular complications, one of the major causes of patient death. The function of immunosuppressive drugs in this process is currently the object of research. Investigations of medications which would decrease the level of oxidative stress are in progress. Tacrolimus (FK-506) is a medication commonly used in immunosuppressive therapy. It has a better cardiac-lipid profile than cyclosporine A. Some reports about the beneficial effect of tacrolimus on the level of oxidative stress in the organism have appeared. Especially *in vitro* studies and animal tests indicate antioxidative properties for tacrolimus. Decreases in parameters of oxidative stress, such as the concentration of malone dialdehy-



de (MDA), the activity of myeloperoxidase (MPO), and neutrophilic infiltration, were observed after treatment. In *in vitro* studies on endotheliocytes, tacrolimus induced oxidative stress more weakly than other medications and was the only one that did not increase the production of nitric oxide (NO). The protective effect of tacrolimus on inflammatory response in rat liver during ischemia-reperfusion injury, on astrocytes exposed to stimulated ischemia *in vitro*, and in experimental traumatic injury of spinal cord tissues in rats were also described. Findings in patients after transplantation are not so clear and even indicate that the influence of tacrolimus on the activity of antioxidative enzymes in kidneys may be involved in side-effect of tacrolimus.

Key words: tacrolimus • oxidative stress • free radicals

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_61/10789.pdf

Word count: 2601

Tables: –

Figures: –

References: 41

Adres autorki: prof. dr hab. Anna Długosz, Katedra i Zakład Toksykologii Akademii Medycznej we Wrocławiu, ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław; e-mail: adltox@ak.am.wroc.pl

WSTĘP

Reakcje wolnorodnikowe i stres oksydacyjny towarzyszą transplantacjom, a szczególnym problemem jest ich nasilenie podczas niedokrwienia i reperfuzji przeszczepianego narządu. Ograniczenie uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego jest wciąż przedmiotem badań, gdyż jest to główna przyczyna powikłań sercowo-naczyniowych i zgonów po przeszczepie. Wiele danych literaturowych wskazuje na korzystne działanie takrolimusu.

Takrolimus jest antybiotykiem makrolidowym, inhibitorem kalcyneuryny, wyizolowanym z grzybów *Streptomyces tsukubaensis*. Ponieważ w niektórych testach *in vitro* wykazywał aktywność immunosupresyjną 100 razy silniejszą od cyklosporyny, stał się przedmiotem intensywnych badań i szybko został wprowadzony do praktyki klinicznej. Od początku lat 90. dwudziestego wieku stosowany jest w przeszczepach wątroby, serca, nerek i trzustki. Leczenie takrolimusem, w porównaniu z cyklosporyną A (CsA) zmniejszyło częstość epizodów ostrego odrzucania, lecz nie zmieniło istotnie głównych przyczyn utraty przeszczepionej nerki, jakimi są przewlekła nefropatia i zgon chorych z przyczyn sercowo-naczyniowych [39]. Czynniki ryzyka chorób układu krążenia (hiperlipidemia, cukrzyca, nadciśnienie) występują znacznie częściej u biorców przeszczepu nerki niż w ogólnej populacji. Zarówno wymienione czynniki ryzyka, w pewnym stopniu indukowane przez inhibitory kalcyneuryny, jak i toksyczność samych inhibitorów mogą odpowiadać za skrócone przeżycie przeszczepu i śmiertelność biorców. Takrolimus w porównaniu z CsA słabiej zwiększa stężenie lipidów i w mniejszym stopniu podnosi ciśnienie tętnicze, lecz istotnie częściej powoduje cukrzycę. Wiele badań wykonanych w ostatnich latach wskazuje na korzystny wpływ takrolimusu na procesy wolnorodnikowe i stres oksydacyjny. Jednak wyniki uzyskane z badań na zwierzętach różnią się od tych u pacjentów po przeszczepie narządów.

Wolne rodniki uwalniane przez komórki układu immunologicznego są ważnym czynnikiem uszkodzenia tkanek,

także przeszczepu. Aktywne formy tlenu mogą nasilać odpowiedź zapalną przez bezpośrednie uszkodzenie komórek śródbłonna i mezangium, a także przez zwiększenie ekspresji cząsteczek odpowiedzialnych za stan zapalny. W wyniku reakcji aktywnych metabolitów tlenu z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi (PUFA) zawartymi w błonach komórkowych zostaje zapoczątkowana peroksydacja lipidów [6].

WPŁYW TAKROLIMUSU NA USZKODZENIE NIEDOKRWIENNO-REPERFUZYJNE

Typowym przykładem uszkodzenia spowodowanego aktywnymi formami tlenu i obniżeniem obrony antyoksydacyjnej jest reakcja zapalna wywołana niedokrwieniem i reperfuzją. Ten stan powstaje w wyniku przywrócenia czasowo przerwanej dopływu krwi do narządu, jak to się zdarza przy pozyskiwaniu narządów do przeszczepu, w zawałe mięśnia sercowego, czy zatorze tętnic. Ograniczenie uszkodzenia niedokrwienno-reperfuzyjnego wpływa na poprawę czynności narządu, zwiększa jego długotrwałe przeżycie i ma olbrzymie znaczenie kliniczne, stąd też wiele badań doświadczalnych i klinicznych poświęconych jest temu zagadnieniu.

Wykazano korzystny wpływ takrolimusu na niedokrwienie i reperfuzję w modelu autoprzeszczepu skóry u szczurów. Oceniano przeżywalność przeszczepu, zawartość MDA w tkance, aktywność mieloperoksydazy oraz obecność nacieku neutrofilowego w skórze po jednej i po 24 godzinach po reperfuzji. Naciek neutrofilowy przyczynia się do wzrostu ilości wolnych rodników tlenowych i uszkodzenia narządu. Podanie takrolimusu trzy dni przed przeszczepem spowodowało znaczący spadek stężenia MDA, mieloperoksydazy i nacieku neutrofilowego w grupach zwierząt leczonych zarówno dawką 0,3 jak i 0,5 mg/kg m.c./dzień [1]. Podobne działanie takrolimusu, powodujące obniżenie stężenia wolnych rodników, cytokin i redukcję nacieku neutrofilowego, stwierdzono u szczurów z ostrym niedokrwieniem wątroby. Szczury, którym podawano takroli-

mus (w dawce 0,3 mg/kg m.c.) 4 godziny przed wywołaniem niedokrwienia, w badaniach wykonanych cztery godziny po reperfuzji, wykazywały znacząco niższe parametry stresu oksydacyjnego w tkance wątrobowej, niższe stężenia cytokin (TNF-alfa i IL-1), lepsze funkcjonowanie wątroby i mniejsze zmiany morfologiczne w wycinkach wątroby. Obniżenie wolnych rodników było związane m.in. z hamowaniem dwóch różnych kompleksów (III i V) w łańcuchu transportu elektronów [31]. Siedmiodniowe przeżycie szczurów znacząco wzrosło: z 20 w grupie kontrolnej do 55% w grupie leczonej takrolimusem. Te badania wskazują na korzystny, protekcyjny wpływ takrolimusu na odpowiedź zapalną wątroby podczas niedokrwienia i reperfuzji [5].

Korzystne działanie podczas reperfuzji nerki pobranej od świni po zatrzymaniu krążenia, obserwowano u zwierząt, którym podano takrolimus łącznie z mykofenolanem mofetylu (MMF) [35]. Lek podawano 20 minut przed zatrzymaniem krążenia. Stwierdzono istotny spadek stężenia cytokiny TNF-alfa w osoczu, chociaż sam takrolimus nie powodował wyraźnego wpływu na TNF-alfa. TNF-alfa stymuluje komórki mezangium i śródbłonka do uwalniania wolnych rodników, przyczyniając się do uszkodzenia nerki [26]. Badania Yanga i wsp. wykazały, że podawanie takrolimusu szczerom sześć godzin przed wywołaniem niedokrwienia zmniejszyło nasilenie apoptozy po reperfuzji i wpływało na poprawę czynności nerki, prawdopodobnie w wyniku wzbudzenia syntezy białka szoku cieplnego [40]. Cytoprotekcyjne działanie takrolimusu w uszkodzeniu niedokrwienno-reperfuzyjnym oprócz wpływu na metabolizm wolnych rodników, jest wynikiem poprawy mikrokrążenia, hamowania kaskady zapalenia, poprawy stabilności mitochondriów i aktywacji procesów naprawczych [31]. Przedstawione wyniki mają ważne implikacje kliniczne, bowiem wskazują, że podawanie takrolimusu razem z mykofenolanem mofetylu dawcom przed pobraniem narządów do transplantacji może zmniejszyć zapalenie związane z uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym. Nie stwierdzono istotnego wpływu terapii na MDA i glutation (GSH).

WPLYW TAKROLIMUSU NA STRES OKSYDACYJNY W TRANSPLANTACJI KLINICZNEJ

W transplantacji klinicznej reakcje wolnorodnikowe są odpowiedzialne zarówno za uszkodzenie przeszczepu, jak i za powikłania sercowo-naczyniowe, które są główną przyczyną śmierci chorych. Większość badań u pacjentów po przeszczepie nerki wskazuje na nasilenie procesów wolnorodnikowych, szczególnie peroksydacji lipidowej [2,24]. Ważna jest odpowiedź na pytanie czy takrolimus i inne inhibitory kalcyneuryny hamują czy nasilają stres oksydacyjny u pacjentów po przeszczepie. Wiele danych wskazuje na korzystne antyoksydacyjne działanie takrolimusu, ale są również doniesienia o prooksydacyjnych własnościach tego leku. Perrea i wsp. badali stan oksydacji w 2 grupach chorych po transplantacji nerki leczonych CsA lub takrolimusem. Wykazali znaczne obniżenie stężenia MDA w pierwszym miesiącu po przeszczepie, niezależnie od stosowanego inhibitora kalcyneuryny, w porównaniu z badaniami wykonanymi przed przeszczepem. Badania powtórzone 6 miesięcy po przeszczepieniu wykazywały dalsze obniżanie się stężenia MDA u leczonych

takrolimusem, które było istotnie niższe niż przed i miesiąc po przeszczepieniu, a także istotnie statystycznie niższe w podobnych przedziałach czasowych u pacjentów leczonych CsA [25].

Badania własne wykazały wzmocnienie peroksydacji lipidów u pacjentów po przeszczepie nerki leczonych CsA w stosunku do zdrowych ochotników [2]. W badaniach *in vitro* CsA tylko w dużych stężeniach, zwiększała poziom MDA [27], a takrolimus w małych stężeniach działał antyoksydacyjnie, natomiast w dużych powodował wzrost stężenia MDA. Te wyniki są istotne dla postępowania klinicznego, ponieważ wskazują na związek stresu oksydacyjnego z dużym stężeniem obydwu inhibitorów kalcyneuryny i potwierdzają obserwowaną w klinice toksyczność narządową tych leków w wyższych stężeniach.

W innych badaniach podkreśla się brak różnicy w wielkości stresu oksydacyjnego między leczonymi CsA i takrolimusem (67 pacjentów) ze stabilnym przeszczepem nerek [24]. Nikt z badanych nie otrzymywał leków obniżających cholesterol. Zarówno pacjenci leczeni takrolimusem, jak i CsA wykazali podobnego stopnia wzrost stężenia MDA i obniżenie aktywności peroksydazy glutationu w porównaniu z grupą kontrolną (14 ochotników) [24].

Wskaźniki stresu oksydacyjnego badano u 23 dzieci po transplantacji wątroby, które otrzymywały w leczeniu immunosupresyjnym cyklosporynę lub takrolimus. Zdolność antyoksydacyjna osocza mierzona voltametrycznie (CV) nie różniła się w grupie stosującej leki i kontrolnej. Poziom alfa-tokoferolu i beta-karotenu w osoczu był podobny u leczonych cyklosporyną i takrolimusem. U dzieci, po transplantacji wątroby, uszkodzenia spowodowane stresem oksydacyjnym, oszacowanym przez markery oksydacji protein i lipidów nie wzrosły, a zdolność antyoksydacyjna surowicy uległa zmniejszeniu [7].

ANTYOKSYDACYJNE DZIAŁANIE TAKROLIMUSU NA KOMÓRKI ŚRÓDBŁONKA

Dysfunkcja śródbłonka naczyń jest wczesnym markerem zmian miażdżycowych po transplantacji, tak więc istotnym jest, jak leki stosowane po transplantacji wpływają na procesy wolnorodnikowe w śródbłonku. Badania *in vitro* na ludzkich komórkach śródbłonka pochodzących z mikronaczyń wykazały, że cyklosporyna, rapamycyna i mykofenolan mofetylu silnie indukowały stres oksydacyjny w porównaniu z metyloprednisolonem (MP) i takrolimusem. Indukcja stresu oksydacyjnego przez immunosupresanty miała związek z aktywnością metaboliczną i apoptozą komórek. Wszystkie badane leki oprócz takrolimusu zwiększały wytwarzanie tlenku azotu (NO). Tlenek azotu zaliczany jest do wolnych rodników, gdyż zawiera jeden niesparowany elektron i może reagować z tlenem cząsteczkowym wytwarzając cytotoksyczne peroksynitraty [9]. Metyloprednisolon i MMF wywoływały mniejsze zmiany w czynności komórek śródbłonka w porównaniu z CsA, rapamycyną i takrolimusem [34].

Utlonione LDL stymulują ekspresję cząstek adhezyjnych ICAM-1, VCAM-1 i selektyny E w monocytach, zwiększając adhezję monocytów do komórek śródbłonka [19,20,28]. Badania u 20 chorych po przeszczepie, któ-



rym podawano CsA i następnie takrolimus, wykazały, że takrolimus zmniejszył hiperlipidemię u pacjentów uprzednio leczonych CsA i zwiększył odporność na utlenianie LDL i HDL [22]. Takrolimus jest mniej lipogenny i w porównaniu z cyklosporyną ma lepszy profil sercowo-naczyniowy. Utlenione LDL, wychwytywane przez receptory zmiatające (scavenger) obecne na komórkach endotelialnych i makrofagach stymulują uwalnianie wolnych rodników i tworzenie przez makrofagi komórek piankowatych. Utlenione LDL zwiększają syntezę cytokin w makrofagach oraz transkrypcję genu łańcucha A płytkowego czynnika wzrostu (PDGF) i ekspresję alfa i beta receptorów płytkowych czynników wzrostu na komórkach mięśni gładkich naczyń. Działają cytotoksycznie na komórki mięśni gładkich i na komórki śródbłonna [32]. W następstwie uszkodzenia śródbłonna, obniża się synteza tlenu azotu, nasila się agregacja płytek, dochodzi do zaburzenia homeostazy eikozanoidów. Stymulacja aparatu przykłębuszkowego utlenionymi LDL lub lipoproteinami indukuje tworzenie anionorodnika nadtlenkowego, który stymuluje uwalnianie reniny w sposób autokryny [4]. Aktywacja układu renina-angiotensyna stanowi ważny patomechanizm w rozwoju przewlekłego odrzucania przeszczepu i nadciśnienia tętniczego.

ROLA TAKROLIMUSU W STYMULACJI ENZYMÓW ANTYOKSYDACYJNYCH W NERKACH

Poziom wolnych rodników podlega ścisłej kontroli przez system enzymów antyoksydacyjnych (dysmutazy nadtlenkowe (SOD), katalazy, peroksydazy glutationu (GPx) i reduktazy), nieenzymatycznych antyutleniaczy (tokoferole, glutation, witamina C, pochodne seleniu) i zmiataczy (adrenalina, bilirubina, kwas moczowy, glukoza, kompleksy żelaza, transferyna, karotenoidy, metalotioneiny) [17,18]. Szczególnie silny system obrony przeciw rodnikom tlenowym znajduje się w nerkach [8,12]. Aktywne metabolity tlenu są częścią mechanizmu obrony antyinfekcyjnej nerki, lecz ich nadmierne tworzenie uszkadza nerkę. W odpowiedzi na rodniki komórki nerki zwiększają syntezę dysmutazy, katalazy, peroksydazy i oksygenazy hemowej. Prozapalne cytokiny IL-1, IL-6 i TNF-alfa zwiększają transkrypcję genu dysmutazy nadtlenkowej. Steroidy regulują poziom enzymów antyoksydacyjnych na etapie transkrypcji genu, w kłębuszkach i granulocytach [14].

Wykazano wpływ takrolimusu na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w komórkach nerek. Badania wykonane na nerce świni i na liniach hodowli komórek LLC-PK1 i HEK293 wskazują, że katalaza jest niezbędna w ochronie komórek przed cytotoksycznym działaniem takrolimusu, a nadtlenek wodoru pośredniczy w tej cytotoksyczności [41]. Takrolimus zwiększa w nerce aktywność reduktazy glutationu (GR), jak i glutationu a zmniejsza aktywność katalazy. Katalaza wykazuje działanie ochronne w stosunku do indukowanej takrolimusem śmierci komórek. Nefrotoksyczność takrolimusu można zmniejszyć poprzez wzrost aktywności katalazy. Wykazano, że hormony grasicy podawane łącznie z takrolimusem zapobiegały nefrotoksyczności takrolimusu, powodując wzrost aktywności katalazy [33]. Wielotygodniowe podawanie szczurom takrolimusu łącznie z hormonami grasicy spowodowało zwiększenie aktywności katalazy, podczas, gdy efekt ten nie był tak widoczny po samych hormonach grasicy, któ-

re podobnie jak takrolimus zwiększały aktywność reduktazy glutationu i zawartość wolnego glutationu w nerkach [33]. U pacjentów (23 osoby) leczonych cyklosporyną lub takrolimusem we wczesnym okresie potransplantacyjnym w 1, 3, 7, 14, 28 dniu po transplantacji aktywność enzymów obrony antyoksydacyjnej (GPx, SOD) uległa zwiększeniu, a stężenie MDA obniżeniu w porównaniu z okresem przed transplantacją. Nie stwierdzono różnicy między grupami leczonymi CsA i takrolimusem [38]. Wyniki tych badań wydają się bardziej odzwierciedlać poprawę wynikającą z ustąpienia mocznicy.

Niedawne badania Khanna i wsp. w aloprzeszczepie nerki u szczurów wskazują na rolę stresu oksydacyjnego w uszkodzeniu nerki przez takrolimus. Autorzy podkreślają udział 2 mechanizmów odpowiadających za nefrotoksyczność; pierwszy obniżenie ekspresji genów obrony antyoksydacyjnej (dysmutaza nadtlenkowa i tioredoksyna), odpowiedzialnych za detoksykację wolnych rodników i drugi mechanizm zwiększenie ekspresji podjednostki genów oksydazy NADPH (NOX-1, p22 phox, Rac-1), zwiększających tworzenie wolnych rodników. Wolne rodniki i końcowe produkty peroksydacji lipidów indukują ekspresję TGF-beta 1 w nerce, który jest odpowiedzialny za włóknienie narządu [16].

WPŁYW TAKROLIMUSU NA REAKCJE WOLNORODNIKOWE W INNYCH NARZĄDACH: SERCE, PŁUCA, WĄTROBA, OŚRODKOWY UKŁAD NERWOWY

Takrolimus, podobnie jak CsA, poprawiał funkcję skurczową serca podczas wstrząsu septycznego. Prawdopodobny mechanizm działania jest wynikiem zahamowania drogi sygnałów zależnych od kalcyneuryny, co zapobiega uszkodzeniu mitochondriów przez NO [13,37].

Badania *in vitro* wykazują, że cyklosporyna i takrolimus nie wzmagają oksydacyjnego uszkodzenia komórek nabłonka płuc. Hodowle komórek nabłonka płuc w środowisku zawierającym 1 mmol/l H₂O₂ po 48 h wykazywały zahamowanie wzrostu o 39%. Dodanie CsA lub takrolimusu do hodowli w środowisku H₂O₂ nie wpływało na zmniejszenie przeżywalności komórek, a cyklosporyna i takrolimus nie nasilały cytotoksyczności H₂O₂ [23].

Inne badania *in vitro* na hodowlach komórkowych hepatocytów szczura traktowanych lipopolisacharydami (LPS) w obecności lub nieobecności takrolimusu i rapamycyny, wykazały, że oba leki hamowały ekspresję mRNA indukowanej syntetazy tlenu azotu (iNOS). Pula reaktywnych form tlenu, określona za pomocą cytometrii przepływowej była zmniejszana przez oba badane leki. Ponadto oba leki blokowały wywołaną LPS aktywację czynnika NF-kappa β. Reasumując oba leki immunosupresyjne obniżyły wewnątrzkomórkowy poziom RFT, hamowały wytwarzanie NO i ekspresję mRNA dla iNOS oraz aktywację czynnika NF-kappa β. Autorzy wskazują na przeciwwzajemne właściwości takrolimusu i rapamycyny [36]. Przeciwnie wyniki przedstawili Han i wsp. Wykazali, że takrolimus inkubowany z frakcją mitochondrialną wątroby szczura indukował wytwarzanie wolnych rodników zależnie od czasu ekspozycji na lek [10].

Zaobserwowano także antyoksydacyjne i neuroprotektoryjne działanie takrolimusu w hamowaniu wywołanej halo-

perydołem dyskinezy dróg żółciowych. Badania przeprowadzono na szczurach, u których haloperydol (1 mg/kg m.c.) wywołuje swoiste objawy dyskinezy. Takrolimus podawany szczurom w dawkach 0,5 i 1 mg/kg m.c. zmniejszył odruchy wywołane haloperydołem. Przewlekła terapia haloperydołem znacząco zwiększała w mózgu szczura peroksydację lipidów i obniżała poziom glutationu i innych enzymów obrony antyoksydacyjnej, takich jak: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza. Takrolimus zmniejszył peroksydację lipidów i odbudował obniżone stężenie glutationu wywołane przez terapię haloperydołem. Ponadto odwrócił wywołany haloperydołem obniżony poziom superoksydazy, dysmutazy i katalazy. Autorzy sugerują, że takrolimus może być pomocnym lekiem w wywołanej neuroleptykami dyskinezie dróg żółciowych [30].

Terapia immunosupresyjna może spełniać funkcję neuroprotekcijną w praktyce klinicznej. Takrolimus czy cyklosporyna są ligandami swoistych białek wewnątrzkomórkowych zwanych immunofilinami (dla CsA cyklofilina, dla takrolimusu FKBP-12). Oba te kompleksy oddziałują na kalcyneurynę (seryno-treoninowo białkową fosfatazę 2B), hamując jej aktywność. Immunofiliny występują obficie w mózgu, gdzie ich zawartość wzrasta w odpowiedzi na uszkodzenie. Są dowody na to, że neuroprotekcyjne działanie takrolimusu może wynikać z jego zdolności antyoksydacyjnych polegających na zwiększaniu zawartości zredukowanego glutationu w astrocytach [3]. W niedokrwieniu mózgu stwierdzano wyciek glutationu z astrocytów. Astrocyty szczura hodowane w warunkach niedotlenienia i pozbawione glutationu potraktowane takrolimusem lub cyklosporyną zwiększały wewnątrzkomórkowy poziom zredukowanego glutationu [3]. Zredukowany glutation (GSH) jest tripeptydem z wolną grupą sulfhydrylową, niezbędnym w walce ze stresem oksydacyjnym. Glutation działa w tiolowej postaci zredukowanej (GSH) i utlenionej (GSSG), które ulegają wzajemnym cyklicznym przekształceniom [3]. Znaczenie tych przemian w mózgu potwierdzono w innych pracach [29], gdzie w mitochondriach z komórek mózgu szczura podczas poreperfuzyjnego niedotlenienia, stwierdzano wzrost aktywności peroksydazy glutationu.

Wpływ takrolimusu na peroksydację lipidów badano również w eksperymentalnym pourazowym uszkodzeniu rdzenia kręgowego [15]. Działanie takrolimusu porównywano z metyloprednisolonem. Szczury otrzymywały takrolimus lub metyloprednisolon, albo obydwa leki łącznie. Badania wykazały zmniejszenie peroksydacji lipidów u zwierząt leczonych, w porównaniu z kontrolą. Ponadto zwierzęta, które otrzymywały takrolimus nie miały nacieku granulocytarnego i znacznie mniejszy obrzęk tkanek rdzenia

w porównaniu z leczonymi samym MP. Wyniki tego badania sugerują możliwość zastosowania takrolimusu w uszkodzeniu rdzenia kręgowego w celu zmniejszenia reakcji zapalnej [15].

Chociaż wiele badań wskazuje na korzystny wpływ takrolimusu na regenerację neuronów [21] jego działanie neuroprotekcyjne nie zawsze występuje. Nie wykazano np. wpływu na apoptozę w komórkach dopaminergicznych SH-SY5Y, także u zwierząt z apomorfinowo-indukowaną chorobą Parkinsona. Podawanie przez 7 dni przed indukcją choroby takrolimusu nie odwracało toksycznego działania 6-hydroksydopaminy [21]. Jednak takrolimus hamował apoptozę wywołaną tlenkiem azotu czy topsigarginą [14,21,24].

Obserwuje się szybki wzrost wiedzy na temat mechanizmów, dzięki którym takrolimus wywołuje swoje cytoprotekcyjne działanie. Należą do nich zmiany w mikrokrążeniu, metabolizm wolnych rodników, uruchamianie wapniowo-zależnych ścieżek, kaskada stanu zapalnego, mitochondrialna stabilność, apoptoza, białka stresoodporne i zdrowienie tkanek. W obrębie jądra, działanie takrolimusu polega w głównej mierze na interakcjach z czynnikami transkrypcyjnymi w tym NF-kappa β . Takrolimus jest uznawany przez wielu za przełomowy lek w potransplantacyjnej terapii immunosupresyjnej. Prowadzone badania naukowe ciągle wnoszą nowe elementy do mechanizmu działania takrolimusu [31]. Han i wsp. wykazali zwiększone wytwarzanie wolnych rodników w hodowlach szczurzych komórek mezangialnych inkubowanych z CsA lub takrolimusem. Jednak takrolimus wykazywał słabsze niż CsA działanie prooksydacyjne [11].

Podsumowując, takrolimus w badaniach *in vitro* i na zwierzętach wydaje się korzystnie wpływać na przebieg reakcji wolnorodnikowych w organizmie. W wielu przypadkach pod wpływem tego leku obserwowano spadek parametrów mierzących poziom stresu oksydacyjnego. Opisano również neuroprotekcyjne działanie takrolimusu. Jednak cytotoksyczność takrolimusu prawdopodobnie może być związana z wpływem tego leku na enzymy antyoksydacyjne w komórkach nerek. Ponadto działanie ochronne takrolimusu przed uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym jest lepiej udokumentowane niż korzystny wpływ na procesy wolnorodnikowe u pacjentów po przeszczepie. Przytoczone dane wskazują, że mechanizm wpływu takrolimusu na szlaki wolnorodnikowe w organizmie jest złożony, kryje jeszcze wiele niejasności i wymaga dalszych badań, które być może poszerzą zakres wskazań terapeutycznych tego leku.

PIŚMIENICTWO

- [1] Cetinkale O., Bilgic L., Bolayirli M., Sengul R., Ayan F., Burcak G.: Involvement of neutrophils in ischemia-reperfusion injury of inguinal island skin flaps in rats. *Plast. Reconstr. Surg.*, 1998; 102: 153-160
- [2] Dugosz A., Kuźniar J., Sawicka E., Marchewka Z., Lembas-Bogaczyk J., Sajewicz W., Boratyńska M.: Oxidative stress and coenzyme Q10 supplementation in renal transplant recipients. *Int. Urol. Nephrol.*, 2004; 36: 253-258
- [3] Gabryel B., Toborek T., Malecki A.: Immunosuppressive immunophilin attenuate damage in cultured rat astrocytes depleted of glutathione and exposed to simulated ischemia *in vitro*. Comparison with N-acetylcysteine. *Neurotoxicology*, 2005; 26: 373-384
- [4] Galle J., Heinloth A., Schwedler S., Wanner C.: Effect of HDL and atherogenic lipoproteins on formation of O_2^- and renin release in juxtaglomerular cells. *Kidney Int.*, 1997; 51: 253-260
- [5] Garcia-Criado F.J., Palma-Vargas J.M., Valdunciel-Garcia J.J., Toledo A.H., Misawa K., Gomez-Alonso A., Toledo-Pereyra L.H.: Tacrolimus down-regulate free radicals tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation*, 1997; 64: 594-598
- [6] Gonet B.: Wolne rodniki w zdrowiu i w chorobie. *Pol. Przegl. Radiol.*, 1993; 37: 165-170



- [7] Granot E., Elinav H., Kohen R.: Marker of oxidative stress in cyclosporine-treated and tacrolimus-treated children after liver transplantation. *Liver Transpl.*, 2002; 8: 469–475
- [8] Grimble R.F.: Interaction between nutrients, pro-inflammatory cytokines and inflammation. *Clin. Sci.*, 1996; 91: 121–130
- [9] Grisham M.B.: Interaction between nitric oxide and superoxide: Role in modulating leukocyte adhesion in the postschemic microvasculature. *Transplant. Proc.*, 1995; 27: 2842–2843
- [10] Han S.Y., Chang E.J., Choi H.J., Kwak C.S., Suh S.I., Bae J.H., Park S.B., Kim H.C., Mun K.C.: Effect of tacrolimus on the production of oxygen free radicals in hepatic mitochondria. *Transplant. Proc.*, 2006; 38: 2242–2243
- [11] Han S.Y., Mun K.C., Choi H.J., Kwak C.S., Bae J.H., Suh S.I., Park S.B., Kim H.C., Chang E.J.: Effects of cyclosporine and tacrolimus on the oxidative stress in cultured mesangial cells. *Transplant. Proc.*, 2006; 38: 2240–2241
- [12] Ichikawa I., Kiyama S., Yoshioka T.: Renal antioxidant enzymes: Their regulation and function. *Kidney Int.*, 1994; 45: 1–9
- [13] Joshi M.S., Julian M.W., Huff J.E., Bauer J.A., Xia Y., Crouser E.D.: Calcineurin regulates myocardial function during acute endotoxemia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2006; 173: 999–1007
- [14] Kawamura T., Yoshioka T., Bills T., Fogo A., Ichikawa I.: Glucocorticoid activates glomerular antioxidant enzymes and protects glomeruli from oxidant injuries. *Kidney Int.*, 1991; 40: 291–301
- [15] Kaymaz M., Emmez H., Bukan N., Dursun A., Kurt G., Pasaoglu H., Pasaoglu A.: Effectiveness of FK-506 on lipid peroxidation in the spinal cord following experimental traumatic injury. *Spinal Cord.*, 2005; 43: 22–26
- [16] Khanna A.K., Pieper G.M.: NADPH oxidase subunits (NOX-1, p22phox, Rac-1) and tacrolimus-induced nephrotoxicity in a rat renal transplant model. *Nephrol. Dial. Transpl.*, 2007; 22: 376–385
- [17] Kwiatkowski J.M.: Dysmutaza ponadtlenkowa – struktura, funkcje i filogeneza. *Post. Biochem.*, 1988; 34: 311–333
- [18] Liczmański A.E.: Toksyczność tlenu. II. Mechanizmy ochronne. *Post. Biochem.*, 1988; 34: 293–310
- [19] Linas S.L., Whittenburg D., Parsons P.E., Repine J.E.: Ischemia increases neutrophil retention and worsens acute renal failure: Role of oxygen metabolites and ICAM-1. *Kidney Int.*, 1995; 48: 1584–1591
- [20] Lo S.K., Janakidevi K., Lai L., Malik A.B.: Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. *Am. J. Physiol.*, 1993; 264: 406–412
- [21] Manakowa S., Singh A., Kaariainen T., Taari H., Kulkarni S.K., Mannisto P.T.: Failure of FK-506 (tacrolimus) to alleviate apomorphine-induced circling in rat Parkinson model in spite of some cytoprotective effects in SH-SY5Y dopaminergic cells. *Brain Res.*, 2005; 1038: 83–91
- [22] Martinez Castela A., Ramos R., Seron D., Gil-Vernet S., Fiol C., Gomez-Gerique N., Yzaguirre M.T., Hurtado I., Sabate I., Alsina J., Grinyo J.M.: Effect of cyclosporine and tacrolimus on lipoprotein oxidation after renal transplantation. *Nefrologia*, 2002; 22: 364–369
- [23] Mogayzel P.J. Jr., Wagner T.L.: Cyclosporin and tacrolimus do not potentiate oxidative damage in pulmonary epithelial cells. *Transpl. Int.*, 2003; 16: 709–712
- [24] Moreno J.M., Ruiz M.C., Ruiz N., Gomez I., Vargas F., Asensio C., Osuna A.: Modulation factors of oxidative status in stable renal transplantation. *Transplant. Proc.*, 2005; 37: 1428–1430
- [25] Perrea D.N., Moulakakis K.G., Poulakou M.V., Vlachos I.S., Papachristodoulou A., Kostakis A.I.: Correlation between oxidative stress and immunosuppressive therapy in renal transplant recipients with an uneventful postoperative course and stable renal function. *Int. Urol. Nephrol.*, 2006; 38: 343–348
- [26] Radeke H.H., Meier B., Topley N., Flöge J., Habermehl G.G., Resch K.: Interleukin 1- α and tumor necrosis factor- α induce oxygen radicals production in mesangial cells. *Kidney Int.*, 1990; 37: 767–775
- [27] Sawicka E., Długosz A., Przybylska D.: Badanie wpływu cyklosporyny A na procesy wolnorodnikowe i jej interakcje z antyoksydantami. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2006; 15: 435–444
- [28] Shoskes D.A., Halloran P.F.: Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J. Urol.*, 1996; 155: 1831–1840
- [29] Sims N.R., Anderson M.F., Hobbs L.M., Powell J.A., Zaidan E.: Brain mitochondrial responses to postschemic reperfusion: a role for calcium and hydrogen peroxide? *Dev. Neurosci.*, 2000; 22: 366–375
- [30] Singh A., Naidu P.S., Kulkarni S.K.: Possible antioxidant and neuroprotective mechanism of FK-506 in attenuating haloperidol-induced orofacial dyskinesia. *Eur. J. Pharmacol.*, 2003; 477: 87–94
- [31] St Peter S.D., Moss A.A., Mulligan D.C.: Effects of tacrolimus on ischemia-reperfusion injury. *Liver Transpl.*, 2003; 9: 105–116
- [32] Stiko-Rahm A., Hultgardh-Nilsson A., Regnstrom J., Hamsten A., Nilsson J.: Oxidized and native LDL enhances production of PDGF-AA and the surface expression of PDF receptors in cultured human arterial smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb.*, 1992; 12: 1099–1109
- [33] Tada H., Nakashima A., Awaya A., Fujisaki A., Inoue K., Kawamura K., Itoh K., Masuda H., Suzuki T.: Effect of thymic hormone on reactive oxygen species-scavengers and renal function in tacrolimus-induced nephrotoxicity. *Life Sci.*, 2002; 70: 1213–1223
- [34] Trapp A., Weis M.: The impact of immunosuppression on endothelial function. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2005; 45: 81–87
- [35] Treska V., Molacek J., Kuntscher V., Liska V., Kobr J., Racek J., Kormunda S.: Immunosuppressive agents have an influence on ischemia-reperfusion injury in kidneys procured from non-heart-beating donor: experimental study. *Transplant. Proc.*, 2004; 36: 2931–2934
- [36] Tuñón M.J., Sanchez-Campos S., Gutierrez B., Culebras J.M., Gonzalez-Gallego J.: Effects of FK-506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 2003; 66: 439–445
- [37] Vanaudenaerde B.M., Wuyts W.A., Geudens N., Dupont L.J., Schoofs K., Smeets S., Van Raemdonck D.E., Verleden G.M.: Macrolides inhibit IL17-induced IL8 and 8-isoprostane release from human airway smooth muscle cells. *Am. J. Transplant.*, 2007; 7: 76–82
- [38] Vural A., Yilmaz M.I., Caglar K., Aydin A., Sonmez A., Eyileten T., Acikel C., Gulec B., Kozak O., Oner K.: Assessment of oxidative stress in the early posttransplant period: comparison of cyclosporine A and tacrolimus-based regimens. *Am. J. Nephrol.*, 2005; 25: 250–255
- [39] Webster A.C., Woodroffe R.C., Taylor R.S., Chapman J.R., Craig J.C.: Tacrolimus versus cyclosporine as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomized trial data. *BMJ*, 2005; 331: 810
- [40] Yang C.W., Ahn H.J., Han H.J., Kim W.Y., Li C., Shin M.J., Kim S.K., Park J.H., Kim Y.S., Moon I.S., Bang B.K.: Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506 reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation*, 2001; 72: 1753–1759
- [41] Zhou X., Yang G., Davis C.A., Doi S.Q., Hirszel P., Wingo C.S., Agarwal A.: Hydrogen peroxide mediates FK-506-induced cytotoxicity in renal cells. *Kidney Int.*, 2004; 65: 139–147