

Received: 2009.06.22
Accepted: 2009.11.09
Published: 2009.12.16

Rola estrogenów w chorobie Parkinsona

The role of estrogens in Parkinson's disease

**Violetta Dzieziejko¹, Monika Białecka², Anna Machoy-Mokrzyńska²,
Gabriela Kłodowska-Duda³, Dariusz Chlubek¹**

¹ Katedra Biochemii i Chemii Medycznej, Pomorska Akademia Medyczna

² Katedra Farmakologii, Pomorska Akademia Medyczna

³ Klinika Neurologii „Neuro-Care”, Katowice

Streszczenie

Choroba Parkinsona (PD) jest przewlekle postępującą chorobą neurodegeneracyjną ośrodkowego układu nerwowego, o dużej częstości występowania, wyraźnie zwiększającej się wraz z wiekiem. Choroba ta w znacznym stopniu pogarsza jakość życia i mimo stosowanego leczenia może doprowadzić do inwalidztwa. Stanowi więc nie tylko ważny problem medyczny, ale i społeczny. Neuropatologicznym podłożem tej choroby jest wybiórcze uszkodzenie neuronów dopaminergicznych istoty czarnej mózgu. Skutkiem tego jest zaburzenie równowagi między neuroprzekaznikami w ośrodkowym układzie nerwowym, głównie między dopaminą i acetylocholiną. Podstawowe objawy PD to: drżenie spoczynkowe, sztywność pozapiramidowa, zubożenie ruchowe i zaburzenia odruchów postawy. Choroba Parkinsona określana jako zespół hipertoniczno-hipokinetyczny, charakteryzuje się również współistniejącymi zaburzeniami wegetatywnymi i psychopatologicznymi. Mimo wyraźnego postępu wiedzy na temat mechanizmów uszkodzenia komórek układu dopaminergicznego, etiologia i patogenezą PD nie jest do końca poznana. W pracy dokonano przeglądu czynników mających wpływ na procesy neurodegeneracji układu pozapiramidowego, w oparciu o dostępne piśmiennictwo, z uwzględnieniem badań klinicznych dotyczących choroby Parkinsona. Ponieważ wiadomo, że żeńskie hormony płciowe wpływają również na przekazywanie dopaminergiczne, zwrócono szczególną uwagę na potencjalną rolę estrogenów jako czynnika modulującego ryzyko wystąpienia PD oraz potencjalną możliwość wykorzystania ich działania neuroprotekcijnego.

Słowa kluczowe:

choroba Parkinsona • estrogeny • neurodegeneracja • neuroprotekcja • układ nerwowy

Summary

Parkinson's disease (PD) is a chronic progressive neurodegenerative disorder of the central nervous system. It has a high prevalence, which significantly increases with age. This disease significantly deteriorates the quality of life and, despite treatment, may lead to disability. For these reasons, PD is not only a medical problem, but also a social one. The neuropathological basis of Parkinson's disease is selective degeneration of dopaminergic neurons in the brain's substantia nigra, which results in an imbalance between neurotransmitters in the central nervous system, mainly between dopamine and acetylcholine. The basic symptoms of PD are tremor at rest, extrapyramidal rigidity, bradykinesia, and disturbances of postural reflexes. PD is described as a hypertonic-hypokinetic syndrome. It is also characterized by coexisting vegetative and psychopathological disturbances. In spite of considerable advances in knowledge about the mechanisms of dopaminergic neuron injury, the etiology and pathogenesis of PD are not yet well established. In this paper the authors briefly review agents which influence neurodegenerative processes of the extrapyramidal system based on available literature concerning clinical trials in Parkinson's disease. Since it is known that female sex hormones also influence dopaminergic transmission,

special attention is paid to the potential role of estrogens as agents modulating the risk of PD occurrence and their neuroprotective action.

Key words: Parkinson's disease • estrogens • neurodegeneration • neuroprotection • nervous system

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=900673>

Word count: 3052

Tables: –

Figures: –

References: 61

Adres autorki: dr Violetta Dziedziko, Katedra Biochemii i Chemii Medycznej, Pomorska Akademia Medyczna, Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin; e-mail: viola@sci.pam.szczecin.pl

Wykaz skrótów: **BDNF** – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (brain-derived neurotrophic factor); **CNTF** – rzęskowy czynnik wzrostu (ciliary neurotrophic factor); **E** – estrogeny (estrogens); **GABA** – kwas gamma-aminomasłowy (gamma-aminobutyric acid); **GF** – czynnik wzrostu (growth factor); **HSP** – białka szoku termicznego (heat shock proteins); **HTZ** – hormonalna terapia zastępcza (hormone replacement therapy); **IFN** – interferon; **IGF** – insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor); **IL-1** – interleukina 1 (interleukin 1); **KR-H** – kompleks receptor-hormon (receptor-hormone complex); **MPP⁺** – kation 1-metylo-4-fenylpirydyny (1-methyl-4-phenylpyridinium); **MPTP** – 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyna (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine); **NGF** – czynnik wzrostu nerwu (nerve growth factor); **NMDA** – kwas N-metylo-D-asparaginowy (N-methyl-D-aspartic acid); **NO** – tlenek azotu (nitric oxide); **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy (central nervous system); **PD** – choroba Parkinsona (Parkinson's disease); **RE** – receptor estrogenowy (estrogen receptor); **RS** – receptory steroidowe (steroid receptors); **TNF** – czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor); **SERM** – selektywne modulatory receptora estrogenowego (selective estrogen receptor modulators).

ETIOLOGIA

Choroba Parkinsona (PD) powstaje w wyniku uszkodzenia układu nigrostriatalnego mózgu. Rozwijający się proces zwyrodnieniowy prowadzi do postępującego niszczenia neuronów dopaminergicznych, czego konsekwencją jest niedobór dopaminy w ośrodkowym układzie nerwowym. Patologicznym wykładnikiem PD są cytoplazmatyczne wtręty – ciała Lewy'ego oraz masywne zanik neuronów w części zbitnej substancji czarnej mózgu [43]. Mechanizmy leżące u podłoża tych uszkodzeń są tylko częściowo poznane. PD jest po chorobie Alzheimera drugą, co do częstości występowania chorobą neurodegeneracyjną. Szacuje się, że choroba ta dotyczy około 0,3% ogólnej populacji, a u osób powyżej 65 r.ż. odsetek ten sięga 1–3% [43]. Z tego powodu poznanie etiopatogenezy choroby Parkinsona i identyfikacja czynników sprzyjających jej rozwojowi jest jednym z głównych zadań badaczy, celem opracowania metod prewencji.

EPIDEMIOLOGIA

Początkowo uważano, iż mężczyźni i kobiety zapadają na PD jednakowo często. Wyniki ostatnich badań epidemiologicznych wykazują jednak na wyraźną przewagę mężczyzn wśród pacjentów chorujących na PD [60]. W badaniu Van Den Eedena i wsp. przeprowadzonym w Stanach Zjednoczonych zachorowalność mężczyzn: 19,0/100000 była zdecydowanie wyższa niż kobiet: 9,9/100000 [56].

W badaniach epidemiologicznych przeprowadzonych we Włoszech [2] i Hiszpanii [5] ryzyko zachorowania było dwukrotnie wyższe u mężczyzn niż u kobiet. Dodatkowo hiszpańscy autorzy stwierdzili, że w badanej grupie mężczyzn częstość zachorowania, zwiększała się z wiekiem, natomiast w grupie kobiet była zmniejszona aż do czasu ukończenia przez nie 79 r.ż. [5]. Co jest czynnikiem chroniącym przed rozwojem PD u kobiet? Zależne od płci różnice w zachorowalności zwróciły uwagę badaczy na czynniki hormonalne. Takim czynnikiem jest na przykład stosowanie hormonalnej terapii zastępczej (HTZ). Hormonalna terapia po menopauzie wydaje się redukować ryzyko lub opóźnić rozwój choroby [30,43]. W badaniu Popat i wsp. ryzyko zachorowania na PD u kobiet stosujących HTZ zależało od typu menopauzy. Stosowanie estrogenów u kobiet po histerektomii (z owariektomią lub bez) zwiększało ryzyko zachorowania, natomiast u kobiet z naturalną menopauzą, terapia estrogenowa lub terapia kombinowana estrogenowo-progesteronowa nie miała wpływu na ryzyko zachorowania [37]. Chociaż wyniki takich badań bywają kontrowersyjne, znaczna część autorów obserwowała, że czynniki redukujące stężenie estrogenów (E) zwiększają ryzyko zachorowania na PD [4,38]. Benedetti i wsp. stwierdzili dodatnią korelację między wykonywaną histerektomią a zachorowaniem kobiet na PD [4]. Inni autorzy nie zauważyli różnic między kobietami z PD i grupą kontrolną pod względem typu menopauzy (naturalna vs. chirurgiczna), lecz z kolei zwrócili uwagę na późniejsze pojawienie się *menarche*, rzadsze stosowanie HTZ i posiadanie przez



chorujące kobiety mniejszej liczby dzieci [30]. Ragonese i wsp. zaobserwowali, że na chorobę Parkinsona chorowały częściej kobiety z niższą liczbą lat płodności (poniżej 36 lat) oraz u których sumaryczna liczba miesięcy wszystkich ciąży była dłuższa niż 30 miesięcy. Zauważyli również odwrotną zależność między PD, a chirurgiczną menopauzą [38].

PATOGENEZA

Patogeneza choroby Parkinsona nie jest w pełni wyjaśniona. Wśród czynników prowadzących do śmierci neuronów dopaminergicznych wymienia się m.in. neurotoksyny, stres oksydacyjny i proteolityczny. Coraz większe znaczenie przypisuje się również procesom zapalnym.

Odkrycie neurotoksyny MPTP (1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyny) w latach 80 ub.w., rozpoczęło nową erę w badaniach nad patogenezą PD i pozwoliło na sformułowanie środowiskowej teorii rozwoju choroby Parkinsona. Toksyna ta wchodząca w skład heroiny spowodowała wystąpienie parkinsonizmu u narkomanów. Okazało się, że aktywny metabolit MPTP, tj. MPP⁺ (kation 1-metylo-4-fenylpirydyny) selektywnie wychwytywany przez komórki dopaminergiczne jest inhibitorem kompleksu I mitochondrialnego łańcucha oddechowego [43]. Na modelu zwierzęcym wykazano, że męskie osobniki są bardziej wrażliwe na uszkodzenie przez MPTP [39]. 17-beta-estradiol wydaje się chronić układ nigrostriatalny przed uszkodzeniem wywołanym przez tę toksynę [15,39].

Dotadni związek między narażeniem na inne związki chemiczne (zwłaszcza pestycydy) a ryzykiem wystąpienia PD wykazywało wielu autorów [9,14]. Badania laboratoryjne wskazują na działanie neurotoksyczne pestycydów w wyniku indukowania stresu oksydacyjnego, zahamowania kompleksu I w mitochondriach komórek istoty czarnej [45]. Pestycydy uwalniają żelazo z ferrytyny, potencjalnie promując reakcję Fentona i generując rodniki hydroksylowe. Podejrzewane są także o zmniejszanie zdolności do wymiatania wolnych rodników w następstwie obniżenia stężenia zredukowanego glutationu [52].

W modelu doświadczalnym szczury poddane ekspozycji na rotenon rozwijały objawy parkinsonizmu, a w badaniach neuropatologicznych mózgow tych zwierząt zaobserwowano selektywną degenerację neuronów dopaminergicznych i obecność struktur przypominających ciała Lewy'ego, których jak dotąd nie stwierdzono w żadnym innym zwierzęcym modelu PD [9].

Do uszkodzenia neuronów dopaminergicznych dochodzi prawdopodobnie przy współdziałaniu kilku różnych mechanizmów wzajemnie się dopełniających. Szczególnie dużą uwagę przywiązuje się do ww. stresu oksydacyjnego. Zjawisko to powstaje w wyniku uwolnienia nadmiernej liczby wolnych rodników (np. poprzez jony żelaza), które uszkodzają komórkę nerwową za pośrednictwem peroksydacji lipidów błon komórkowych lub uruchomienia zjawiska apoptozy [22,24,54]. Teoria stresu proteolitycznego zakłada, że ostatnim ogniwem neurodegeneracji jest zawsze (niezależnie od wyjściowego mechanizmu), upośledzenie metabolizmu białek powstających wewnątrz komórki. Wolne rodniki mogą oddziaływać z różnymi molekułami

powodując zaburzenia działania systemu ubikwityno-proteosomalnego. Uszkodzenie tego systemu jest przyczyną gromadzenia się nieprawidłowych białek, powstawania wrętów komórkowych (takich jak ciała Lewy'ego) oraz może prowadzić do degeneracji i ostatecznie śmierci komórki dopaminergicznej w mechanizmie stresu proteolitycznego [20].

Również czynniki zapalne mogą odgrywać istotną rolę w procesie neurodegeneracji, a stosowanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych wydaje się chronić lub opóźniać rozwój choroby Parkinsona [13]. W substancji czarnej osób chorych na PD stwierdzono podwyższone stężenia cytokin prozapalnych, tzn. czynnika martwicy nowotworów (TNF- α), interleukiny 1 (IL-1) oraz interferonu gamma (IFN- γ), które mogą oddziaływać na funkcje komórek dopaminergicznych przez stymulowanie wytwarzania tlenku azotu (NO), inicjując stres oksydacyjny oraz aktywność apoptozy [16].

Odkrycie zależności pomiędzy występowaniem dziedzicznej postaci PD a mutacjami A30P i A30T w genie kodującym alfa-synukleinę, których nie stwierdzono w przypadku idiopatycznej postaci PD, zainicjowało liczne badania nad znaczeniem tego białka w patogenezie choroby Parkinsona. Jest ono niskocząsteczkowym (140-aminokwasowym) cytosolowym białkiem presynaptycznych zakończeń nerwowych i błony jądrowej neuronów. Fizjologiczna rola alfa-synukleiny nie jest w pełni wyjaśniona, jednak wiele danych wskazuje, że uczestniczy w uwalnianiu neuroprzekazników oraz w plastyczności neuronalnej. Prawidłowe funkcje tego białka ulegają zaburzeniu podczas jego agregacji. Wiele czynników, takich jak: nadekspresja, swoiste mutacje genu alfa-synukleiny, neurotoksyny oraz stres oksydacyjny indukuje lub wzmacnia agregację tego białka. Nieprawidłowe fałdowanie alfa-synukleiny, jej akumulacja z tworzeniem się ciał Lewy'ego, prowadzą do śmierci komórki dopaminergicznej. Zaburzenia degradacji alfa-synukleiny są również wystarczającym powodem rozwinięcia się zespołu objawów charakterystycznych dla PD. Zrozumienie procesów prowadzących do agregacji alfa-synukleiny może mieć istotne znaczenie w wyjaśnieniu patomechanizmu chorób neurodegeneracyjnych i ich terapii [23].

ESTROGENY CZYNNIKIEM MODULUJĄCYM RYZYKO WYSTĄPIENIA CHOROBY PARKINSONA

Skomplikowane procesy patologiczne zachodzące w neuronie dopaminergicznym podlegają regulacji środowiskowej i genetycznej. Od dawna poszukuje się czynników zwiększających lub zmniejszających indywidualną podatność na zachorowanie na PD. W ostatnich latach coraz większą uwagę poświęca się znaczeniu hormonów, w tym estrogenów, jako czynników modulujących ryzyko wystąpienia choroby Parkinsona. Coraz częściej pojawiają się również prace na temat ochronnego działania estrogenów na komórki ośrodkowego układu nerwowego [28]. Ze względu na rosnący problem występowania chorób z kręgu neurodegeneracyjnych, potrzeba znalezienia skutecznej profilaktyki lub farmakoterapii tych schorzeń skłania wielu badaczy do zwrócenia uwagi na potencjalnie neurocytoprotekcyjne działanie estrogenów.

Estrogeny (E) charakteryzują się wielokierunkowym działaniem. Te niezwykle wszechstronne hormony kształtują

funkcje rozrodcze, wpływają na metabolizm tkanki kostnej, układ krążenia, a także na procesy poznawcze. Działają za pośrednictwem receptora należącego do grupy receptorów steroidowych (RS), tzw. nadrodziny steroidowo-tarczycowego receptora hormonalnego. Podstawową funkcją receptorów steroidowych oraz związków będących ich agonistami jest regulacja ekspresji swoistych genów w komórkach tkanek docelowych. Biologiczne działanie steroidu zależy od wielu czynników pochodzących zarówno z komórki, jak i ze środowiska zewnątrzkomórkowego. Na przykład za pobudzenie RS odpowiada stężenie wolnego hormonu w osoczu, jego powinowactwo do receptora oraz liczba receptorów. Reakcja receptora na działanie hormonów uzależniona jest także od czasu ekspozycji. Wysokie stężenia hormonów działające długotrwale mogą modyfikować funkcje RS przez zmniejszenie jego wrażliwości [58]. Receptory steroidowe wykazują pewne cechy nieswoistości, polegające na zdolności do wiązania i pobudzania tychże receptorów przez różne hormony. Przykładem omawianego zjawiska jest wiązanie estrogenów z receptorem androgenowym, a także pobudzanie receptorów estrogenowych przez androgeny zawierające grupę hydroksylową w pozycji C3 i C17. Dodatkową cechą nieswoistości wyróżniającą receptory estrogenowe jest zjawisko różnej siły działania egzogennych estrogenów, i tak słabe estrogeny mogą działać jak estrogeny silne [31,33,59].

Wynik pobudzenia RS zależy od prawidłowo przebiegającej interakcji między receptorem a jego agonistą. Receptor steroidowy umiejscowiony w cytoplazmie wiąże hormon, a następnie przemieszcza się do jądra komórki [35]. Utworzenie kompleksu receptor-hormon (KR-H) jest procesem niezbędnym do wywołania strukturalnych i biochemicznych zmian w obrębie receptora. Powyższe zmiany, polegające głównie na dimeryzacji cząstek receptora i aktywacji kinaz, stanowią warunek uzyskania zdolności wiązania receptora z DNA. Dodatkowo uwolnienie białka szoku termicznego HSP 90 (heat shock protein 90) sprzyja przechodzeniu kompleksu KR-H do jądra komórkowego oraz prowadzi do odsłonięcia obszaru receptora mającego zdolność wiązania z jądrowym miejscem akceptorowym. Kolejny etap to wzrost ekspresji genów, wynikiem którego jest synteza białek o różnej funkcji biologicznej. Ostatni etap opisanej przemiany polega na odłączeniu receptora z kompleksu i jego powrocie do cytoplazmy [26].

Klasyczny ludzki receptor estrogenowy (RE) jest zbudowany z 590–600 aminokwasów tworzących 6 funkcjonalnych domen. Domeny A i B są umiejscowione w N-końcowym fragmencie receptora, odpowiedzialnym za jego transaktywację. Miejsce rozpoznawania i wiązania sekwencji HRE (hormone response element) w regulatorowych fragmentach genów znajduje się w domenach CI i CII. Sekwencję umożliwiającą transport receptora do jądra komórkowego ma domena D. Rola C-końcowego fragmentu receptora polega na wiązaniu hormonu, białka HSP 90 oraz bierze udział w tworzeniu dimerów receptora [59].

Odkryto dwa receptory estrogenowe: alfa (RE-alfa) i beta (RE-beta) oraz wykazano istotne różnice w ich rozmieszczeniu w różnych narządach, w tym odmienną lokalizację obu rodzajów receptorów w mózgu. RE-alfa dominuje w jądrze ciała migdałowatego oraz jądrach grzbietowo-bocznym i tylnobocznym podwzgórza [35]. Dużą ekspresję

RE-beta w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) wykazano głównie w jądrze łukowatym i brzuszno-przyśrodkowym podwzgórza. Obecność receptorów estrogenowych w OUN sugeruje możliwość regulacji procesów behawioralnych przez oddziaływanie estrogenów na swoiste receptory. Na modelu doświadczalnym Register i wsp. wykazali, że poprzez zmianę aktywności receptora beta podwzgórza i hipokampa można wyjaśnić patogenezę procesów otępiennych i zaburzeń pamięci związanych z okresem pomenopauzalnym [40]. Opisywane RE-alfa i RE-beta tworzą poza postaciami homodimerycznymi (alfa/alfa, beta/beta) również postacie heterodimeryczne np. alfa/beta [58]. Lokalizacja dwóch typów RE oraz różny wskaźnik powinowactwa do ligandów postaci homo- i heterodimerycznych jest przyczyną odmiennego działania w zależności od typu receptora [25].

Estrogenom przypisuje się właściwości neuroprotektoryjne [42], które można podzielić na miejscowe oraz obwodowe. Miejscowe działanie estrogenów oznacza bezpośredni wpływ hormonów na neurony, komórki glejowe lub inne struktury układu nerwowego. Estrogeny wpływają na komórki nerwowe przez pobudzenie receptora estrogenowego lub pozareceptorowo [58]. Neuroprotektoryjne działanie estrogenów badano na modelu doświadczalnym niedokrwienia mózgu oraz w urazach czaszkowo-mózgowych i wykazano ich wielokierunkowe działanie w rejonie tkanki nerwowej objętej uszkodzeniem. Estrogeny pobudzały wydzielanie czynników wzrostowych: BDNF (neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego) czy NGF (czynnik wzrostu nerwu), aktywowały transmisję GABAergiczną, oddziaływały korzystnie na komórki glejowe oraz hamowały apoptozę [32]. Działając pozareceptorowo neutralizowały toksyczności glutaminianów pobudzających receptor NMDA (receptor kwasu N-metylo-D-asparaginowego) [19,31].

ESTROGENY A APOPTOZA KOMÓREK OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

Proces apoptozy jest uważany za końcowy etap molekularnego uszkodzenia komórek OUN. Decydującą rolę w kontroli tego zjawiska pełni rodzina czynników Bcl-2, w obrębie której znajdują się białka zaangażowane w regulację procesu programowanej śmierci wielu typów komórek, w tym neuronów. Rola antyapoptotyczna białek Bcl-2 i Bcl-XL polega na hamowaniu aktywności proteaz cysteinowych (kaspaz), enzymów odpowiedzialnych za rozpoczęcie procesu apoptozy. Z wyników badań przeprowadzonych na modelu zwierzęcym wiadomo, że estradiol zwiększa ekspresję czynnika Bcl-2 i Bcl-XL, m.in. w ośrodkowym układzie nerwowym [47]. Przypuszczalnie odbywa się to na skutek zahamowania reakcji między mRNA dla Bcl-2 a białkiem Nip-2, spełniającym rolę inhibitora syntezy Bcl-2 [12,50]. Estradiol może również w sposób bezpośredni zwiększać syntezę czynnika Bcl-2 lub hamować ekspresję czynnika Par-4 (prostate apoptosis response-4), którego aktywność wyraźnie wzrasta w neuronach objętych procesem niedokrwienia [19]. Jak wynika z przedstawionych informacji estrogeny mogą ochraniać komórki nerwowe przed działaniem wolnych rodników oraz indukowaną kwasem glutaminowym śmiercią komórki. Wydaje się, że podstawowym, choć nie jedynym mechanizmem antyapoptycznego działania tych hormonów jest zmiana aktywności



poszczególnych czynników z grupy Bcl-2. Jak wykazano doświadczalnie estrogeny znacząco zwiększają ilość czynnika Bcl-XL w kulturze komórek hipokampa, co wtórnie prowadzi do zmniejszenia aktywności procesu apoptozy indukowanej beta-amyloidem [36].

Korzystny wpływ estrogenów na zjawisko hamowania apoptozy w komórkach OUN ma również związek z oddziaływaniem estrogenów na krążenie mózgowe. Ekspresja czynnika Bcl-2 w obszarze penumbry (obszar częściowego niedokrwienia) może częściowo zależeć od estrogenów. Zwiększenie wskaźnika łączenia się hormonów z receptorem estrogenowym typu beta skutkuje przerwaniem tzw. „down regulation” białka Bcl-2 w neuronach objętych niedokrwieniem. Chen i wsp. wykazali również, że estrogeny pobudzają regenerację uszkodzonych włókien aksonalnych poprzez zwiększenie ekspresji czynnika Bcl-2 [12].

NEUROPROTEKCYJNE DZIAŁANIE ESTROGENÓW

Wyniki licznych badań wskazują komórki glejowe jako miejsce regulacji rozwoju i plastyczności wielu populacji neuronów. Aktywowane komórki glejowe uczestniczą w procesie wiodącym do śmierci komórek nerwowych. Jednym ze związków inicjującym śmierć komórek nerwowych jest TNF- α . Boka i wsp. stwierdzili obecność TNF-immunoreaktywnych komórek glejowych w substancji czarnej osób z PD [8]. Dalsze badania wykazały, że niedobór receptorów TNF chroni komórki nerwowe przed neurotoksycznym działaniem MPTP poprzez supresję aktywacji mikrogleju [48]. Estrogeny na innej zasadzie – przez zmianę aktywności genów – zmniejszają ekspresję TNF- α . Efekt ten jest swoisty tkankowo ze względu na różnice w aktywności transkrypcyjnej RE-alfa i RE-beta oraz interakcje między kompleksem RE i czynnikami transkrypcyjnymi AP-1 (activator protein-1) i NF-kappaB [16].

Członkowska i wsp. wykazali na modelu zwierzęcym, że MPTP podwyższa ekspresję TNF- α w sposób zależny od płci. U osobników męskich ekspresja TNF- α była większa, podczas gdy u samic ekspresja interleukiny 6 wykazywała umiarkowanie zwiększoną wartość, a ten właśnie czynnik wydaje się pełnić ważną rolę w procesie regeneracji komórek nerwowych poddanych uszkodzeniu [16].

Dodel i wsp. stwierdzili, że estradiol działa cytoprotekcyjnie przez zmniejszenie aktywności czynnika NF-kappaB w astrogliu w przebiegu narażenia na amyloid beta (1-40) i lipopolisacharyd [17]. Jest to możliwe z powodu obecności receptorów estrogenowych na różnego rodzaju komórkach glejowych. Dodatkowo korzystne działanie estrogenów może mieć związek z uwalnianiem z komórek glejowych czynników wzrostu, neurotrofin lub innych substancji o działaniu regulującym. Jedną z nich jest apolipoproteina E. Estrogeny zwiększają ekspresję apoE *in vivo* i *in vitro* w komórkach astro i mikrogleju [51]. Ciekawym odkryciem było stwierdzenie lokalnej syntezy estrogenów w astrocytach w odpowiedzi na uszkodzenie lub zwiększenie transmisji aminokwasów pobudzających. Fakt ten dodatkowo potwierdza udział tych hormonów w procesie ochrony komórek nerwowych [1].

Stwierdzono, że grupa tzw. białkowych czynników wzrostu (growth factor – GF) wykazuje rolę neuroprotekcijną

w niedokrwieniu komórek OUN. Do najlepiej poznanych przedstawicieli tej grupy należą rzęskowy czynnik wzrostu (CNTF), czynnik wzrostu pochodzenia mózgowego (BDNF) oraz insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF). Prawdopodobny mechanizm działania tych związków polega na zahamowaniu dokomórkowego napływu jonów wapnia, co pośrednio zapobiega procesom nekrozy lub apoptozy w uszkodzonych rejonach OUN. W ostatnim czasie szczególne zainteresowanie budzi wzajemna zależność między estrogenami a IGF [11]. Badania prowadzone na modelu doświadczalnym wykazały synergiczny wpływ estrogenów i IGF na przeżycie neuronów oraz na plastyczność synaps w OUN [27]. Jednym z przytaczanych mechanizmów działania zarówno IGF, jak i estrogenów może być pobudzenie ekspresji Bcl-2 lub blokowanie neurotransmisji zależnej od receptora kainowego [1]. Kolejnym interesującym spostrzeżeniem jest stwierdzenie zależności między estrogenami a neurotrofiną. Estrogeny regulują ekspresję neurotrofiny i jej receptorów, a neurotrofina reguluje ekspresję receptorów estrogenowych w różnych komórkach OUN. Obecność receptorów dla obu tych czynników w tych samych komórkach oraz podobny kierunek działania sugerują ważną rolę estrogenów i neurotrofiny w kaskadzie działania neuroprotekcijnego [53].

Pozareceptorowe działanie estrogenów polega na przeciwdziałaniu śmierci neuronów indukowanej poprzez receptor NMDA. Zjawisko pobudzania receptora NMDA przez nadmiar kwasu glutaminowego jest jednym z mechanizmów uszkadzających komórkę OUN w chorobach neurodegeneracyjnych, urazach oraz stanach niedokrwienia. Wewnątrzkomórkowe gromadzenie się jonów wapnia oraz aktywacja procesów wolnorodnikowych stanowią pierwszą linię czynników uszkadzających neurony. Estrogeny mają zdolność neutralizowania wyżej opisywanych przemian poprzez potencjalne właściwości antyoksydacyjne. Powyższe zdolności zależą od dawki hormonu, z tendencją do zwiększania efektywności przy bardzo wysokich stężeniach. Dodatkowym działaniem estrogenów jest bezpośrednio hamowanie aktywności receptora NMDA oraz zwiększanie uwalniania kwasu gamma aminomasłowego, co jest równoznaczne z pobudzeniem układu GABAergicznego [57].

Hirohata i wsp. w swoich najnowszych badaniach *in vitro* wykazali, że estrogeny, a zwłaszcza estriol i estradiol hamują agregację alfa-synukleiny oraz destabilizują utworzone przez nią fibryle. Przypuszcza się, że hormony te mogą być brane pod uwagę jako czynniki zapobiegawcze lub stosowane w leczeniu alfa-synukleinopatii (w tym również PD) [22].

ZASTOSOWANIE ESTROGENÓW W TERAPII CHOROBY PARKINSONA

Choroby OUN są częste, a ich farmakoterapia pozostawia wiele do życzenia. Mechanizmy neurodegeneracji wydają się zbliżone, co wielokrotnie potwierdzają obserwacje kliniczne. Choroba Parkinsona może przebiegać z otępieniem i depresją, podczas gdy chorzy z chorobą Alzheimera wykazują obecność objawów pozapiramidowych.

Powstały prace opisujące wpływ estrogenów na ryzyko wystąpienia i przebieg niektórych chorób neurologicznych i psychiatrycznych [3,6,10,21]. Obserwowane przez

badaczy różnice w przebiegu choroby zależne od płci (cięższy przebieg choroby u mężczyzn, a u kobiet częściej dyskinezy i zaburzenia psychiczne) mogą być częściowo tłumaczone wpływem estrogenów. Hormonalna terapia zastępcza (HTZ) była w badaniu Saunders-Pullman i wsp. związana z mniejszym nasileniem objawów chorobowych u kobiet we wczesnej fazie choroby Parkinsona, niestosujących jeszcze lewodopy [44]. Tsang i wsp. badali skuteczność terapii, tolerancję i bezpieczeństwo doustnych estrogenów u kobiet w podobnym wieku z fluktuacjami ruchowymi, które były leczone porównywalnymi dawkami leków przeciwparkinsonowskich, przy podobnej długości trwania choroby. Stwierdzili poprawę i wydłużenie okresu dobrej sprawności u kobiet, które stosowały estrogeny [55]. W innym badaniu Blanchet i wsp. wykazali, że leczenie transdermalne 17-beta-estradiolem spowodowało możliwość zmniejszenia dawki lewodopy u kobiet z dyskinezami, chociaż nie miało to wpływu na nasilenie dyskinez [7]. Marder i wsp. wskazali na protekcyjne działanie HTZ na rozwój otępienia w PD [29]. Wydaje się, że w świetle dotychczasowych badań estrogeny mogą się okazać skuteczne w prewencji nie tylko choroby Parkinsona, ale również otępienia czy udaru [30,46,55].

Wyniki badań związku estrogenów z chorobą Parkinsona nie są spójne, niektóre badania nie potwierdzają korzystnego działania estrogenów [49]. Obserwacje nie są powtarzalne, co może wynikać z wpływu wielu różnych czynników, takich jak rodzaj stosowanej terapii, dawka, czas trwania leczenia, okres rozpoczęcia terapii, wiek chorych itp.

Stosowanie leków estrogenowo-progesteronowych po menopauzie jest obciążone ryzykiem działań niepożądanych [41]. Wiele pytań dotyczących działania neuroprotektynowego estrogenów pozostaje bez jednoznacznej odpowiedzi. Zachęcające wyniki uzyskane na modelach doświadczalnych nie zawsze znajdują potwierdzenie w badaniach klinicznych. Może dlatego w wielu ośrodkach badawczych zwrócono uwagę na bezpieczniejszą grupę leków, tzw. selektywne modulatory receptora estrogenowego (selective estrogen receptor modulators – SERM). W przeszłości większość z leków należących do SERM zaliczano do preparatów antiestrogenowych. Obecnie wiadomo, że działanie SERM w tkankach docelowych jest różne w zależności od powinowactwa do receptorów estrogenowych oraz wewnętrznej aktywności poszczególnych leków (działanie agonistyczne lub antagonistyczne). Preparaty należące do SERM wykorzystywane są w leczeniu osteoporozy oraz niektórych guzów sutka i jajnika [34]. Niedawne doniesienia mówią o korzystnym wpływie raloksyfenu na funkcje poznawcze kobiet z otępieniem typu alzheimerowskiego [61]. Wydaje się, że leki należące do SERM mogą w przyszłości stanowić alternatywę w stosunku do terapii estrogenowej [18]. Korzystny profil farmakodynamiczny i – co ważne – nieliczne działania niepożądane, być może pozwolą na ich zastosowanie w wielu chorobach neurodegeneracyjnych zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn.

Problem roli estrogenów w prewencji i leczeniu PD pozostaje otwarty i wymaga dalszych badań, jednak w ocenie autorów stosowanie hormonalnej terapii zastępczej przy braku ogólnych przeciwwskazań wydaje się dla pacjentek korzystne.

PIŚMIENICTWO

- [1] Azcoitia I., Sierra A., Garcia-Segura L.M.: Estradiol prevents kainic acid-induced neuronal loss in the rat dentate gyrus. *Neuroreport*, 1998; 9: 3975–3079
- [2] Baldereschi M., Di Carlo A., Rocca W.A., Vanni P., Maggi S., Perissinotto E., Grigoletto F., Amaducci L., Inzitari D.: Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. *Italian Longitudinal Study on Aging. Neurology*, 2000; 55: 1358–1363
- [3] Behl C.: Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Prog. Neurobiol.*, 1999; 57: 301–323
- [4] Benedetti M.D., Maraganore D.M., Bower J.H., McDonnell S.K., Peterson B.J., Ahlskog J.E., Schaid D.J., Rocca W.A.: Hysterectomy, menopause, and estrogen use preceding Parkinson's disease: an exploratory case-control study. *Mov. Disord.*, 2001; 16: 830–837
- [5] Benito-León J., Bermejo-Pareja F., Morales-González J.M., Portet-Lissac J., Trincado R., Vega S., Louis E.D.: Neurological Disorders in Central Spain (NEDICES) Study Group: Incidence of Parkinson disease and parkinsonism in three elderly populations of central Spain. *Neurology*, 2004; 62: 734–741
- [6] Birge S.J.: The role of estrogen in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurology*, 1997; 48: S36–S41
- [7] Blanchet P.J., Fang J., Hyland K., Arnold L.A., Mouradian M.M., Chase T.N.: Short-term effects of high-dose 17beta-estradiol in postmenopausal PD patients: a crossover study. *Neurology*, 1999; 53: 91–95
- [8] Boka G., Anglade P., Wallach D., Javoy-Agid F., Agid Y., Hirsch E.C.: Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, 1994; 172: 151–154
- [9] Butcher J.: Scientists suggest a link between rotenone and Parkinson's disease. *Lancet*, 2000; 356: 1659
- [10] Canuso C.M., Goldstein J.M., Green A.I.: The evaluation of women with schizophrenia. *Psychopharmacol. Bull.*, 1998; 34: 271–277
- [11] Cardona-Gómez G.P., Mendez P., DonCarlos L.L., Azcoitia I., Garcia-Segura L.M.: Interactions of estrogen and insulin-like growth factor -I in the brain: molecular mechanisms and functional implications. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2002; 83: 211–217
- [12] Chen D.F., Schneider G.E., Martinou J.C., Tonegawa S.: Bcl-2 promotes regeneration of severed axons in mammalian CNS. *Nature*, 1997; 385: 434–439
- [13] Chen H., Zhang S.M., Hernán M.A., Schwarzschild M.A., Willett W.C., Colditz G.A., Speizer F.E., Ascherio A.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. *Arch. Neurol.*, 2003; 60: 1059–1064
- [14] Costello S., Cockburn M., Bronstein J., Zhang X., Ritz B.: Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am. J. Epidemiol.*, 2009; 169: 919–926
- [15] Culmsee C., Vedder H., Ravati A., Junker V., Otto D., Ahlemeyer B., Krieg J.C., Krieglstein J.: Neuroprotection by estrogens in a mouse model of focal cerebral ischemia and in cultured neurons: evidence for a receptor-independent antioxidative mechanism. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1999; 19: 1263–1269
- [16] Czlonkowska A., Ciesielska A., Gromadzka G., Kurkowska-Jastrzebska I.: Estrogen and cytokines production – the possible cause of gender differences in neurological diseases. *Curr. Pharm. Des.*, 2005; 11: 1017–1030
- [17] Dodel R.C., Du Y., Bales K.R., Gao F., Paul S.M.: Sodium salicylate and 17β-estradiol attenuate nuclear transcription factor NF-κB translocation in cultured rat astroglial cultures following exposure to amyloid Aβ(1-40) and lipopolysaccharides. *J. Neurochem.*, 1999; 73: 1453–1460
- [18] DonCarlos L.L., Azcoitia I., Garcia-Segura L.M.: Neuroprotective actions of selective estrogen receptor modulators. *Psychoneuroendocrinology*, 2009; (w druku)
- [19] Garcia-Segura L.M., Azcoitia I., DonCarlos L.L.: Neuroprotection by estradiol. *Prog. Neurobiol.*, 2001; 63: 29–60
- [20] Giorgi F.S., Bandettini di Poggio A., Battaglia G., Pellegrini A., Murri L., Ruggieri S., Paparelli A., Fornai F.: A short overview on the role of alpha-synuclein and proteasome in experimental models of Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.*, 2006; 70: 105–109



- [21] Henderson V.W., Paganini-Hill A., Miller B.L., Elble R.J., Reyes P.F., Shoupe D., McCleary C.A., Klein R.A., Hake A.M., Farlow M.R.: Estrogen for Alzheimer's disease in women: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Neurology*, 2000; 54: 295–301
- [22] Hirohata M., Ono K., Morinaga A., Ikeda T., Yamada M.: Anti-aggregation and fibril-destabilizing effects of sex hormones on alpha-synuclein fibrils *in vitro*. *Exp. Neurol.*, 2009; 217: 434–439
- [23] Kaźmierczak A., Adamczyk A., Strosznajder J.: Udział α -synukleiny w funkcji układu dopaminergicznego. *Post. Biol. Komórki*, 2007; 34: 377–390
- [24] Keller J.N., Germeyer A., Begley J.G., Mattson M.P.: 17 β -estradiol attenuates oxidative impairment of synaptic Na⁺/K⁺-ATPase activity, glucose transport, and glutamate transport induced by amyloid β -peptide and iron. *J. Neurosci. Res.*, 1997; 50: 522–530
- [25] Kuiper G.G., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Häggblad J., Nilsson S., Gustafsson J.A.: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 1997; 138: 863–870
- [26] Kulig E.: Receptor estrogenowy: budowa i funkcja w normalnej i neoplastycznej tkance. *Post. Biochemii*, 1994; 40: 222–229
- [27] Lebesgue D., Chevaleyre V., Zukin R.S., Eigen A.M.: Estradiol rescues neurons from global ischemia-induced cell death: Multiple cellular pathways of neuroprotection. *Steroids*, 2009; 74: 555–561
- [28] Li X.L., Cheng W.D., Li J., Guo X.L., Guo C.J., Meng X.H., Sun S.G., Wang L.X.: Protective effect of estrogen on apoptosis in a cell culture model of Parkinson's disease. *Clin. Invest. Med.*, 2008; 31: E258–E264
- [29] Marder K., Tang M.X., Alfaro B., Mejia H., Cote L., Jacobs D., Stern Y., Sano M., Mayeux R.: Postmenopausal estrogen use and Parkinson's disease with and without dementia. *Neurology*, 1998; 50: 1141–1143
- [30] Martignoni E., Nappi R.E., Citterio A., Calandrella D., Corengia E., Fignon A., Zangaglia R., Riboldazzi G., Pacchetti C., Nappi G.: Parkinson's disease and reproductive life events. *Neurol. Sci.*, 2002; 23: S85–S86
- [31] McEwen B.S.: Clinical review 108: The molecular and neuroanatomical basis for estrogen effects in the central nervous system. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999; 84: 1790–1797
- [32] Miranda R., Sohrabji F., Singh M., Toran-Allerand D.: Nerve growth factor (NGF) regulation of estrogen receptors in explant cultures of the developing forebrain. *J. Neurobiol.*, 1996; 31: 77–87
- [33] Mosselman S., Polman J., Dijkema R.: ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.*, 1996; 392: 49–53
- [34] Okapinski B., Krysiak R., Herman Z.S.: Selective estrogen receptor modulators. *Pol Arch Med Wewn.*, 2002; 107: 75–83
- [35] Osterlund M., Kuiper G.G., Gustafsson J.A., Hurd Y.L.: Differential distribution and regulation of estrogen receptor- α and - β mRNA within the female rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.*, 1998; 54: 175–180
- [36] Pike C.J.: Estrogen modulates neuronal Bcl-XL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*, 1999; 72: 1552–1563
- [37] Papat R.A., Van Den Eeden S.K., Tanner C.M., McGuire V., Bernstein A.L., Bloch D.A., Leimpeper A., Nelson L.M.: Effect of reproductive factors and postmenopausal hormone use on the risk of Parkinson disease. *Neurology*, 2005; 65: 383–390
- [38] Ragonese P., D'Amelio M., Salemi G., Aridon P., Gammino M., Epifanio A., Morgante L., Savettieri G.: Risk of Parkinson disease in women: effect of reproductive characteristics. *Neurology*, 2004; 62: 2010–2014
- [39] Ramirez A.D., Liu X., Menniti F.S.: Repeated estradiol treatment prevents MPTP-induced dopamine depletion in male mice. *Neuroendocrinology*, 2003; 77: 223–231
- [40] Register T.C., Shively C.A., Lewis C.E.: Expression of estrogen receptor alpha and beta transcripts in female monkey hippocampus and hypothalamus. *Brain Res.*, 1998; 788: 320–322
- [41] Rossouw J.E., Anderson G.L., Prentice R.L., LaCroix A.Z., Kooperberg C., Stefanick M.L., Jackson R.D., Beresford S.A., Howard B.V., Johnson K.C., Kotchen J.M., Ockene J.: Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators.: Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 2002; 288: 321–333
- [42] Rudziński W., Krejza J.: Oddziaływanie estrogenów na mózg ze szczególnym uwzględnieniem działania neuroprotekcynowego. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 2002; 36: 143–156
- [43] Samii A., Nutt J.G., Ransom B.R.: Parkinson's disease. *Lancet*, 2004; 363: 1783–1793
- [44] Saunders-Pullman R., Gordon-Elliott J., Parides M., Fahn S., Saunders H.R., Bressman S.: The effect of estrogen replacement on early Parkinson's disease. *Neurology*, 1999; 52: 1417–1421
- [45] Schapira A.H., Cooper J.M., Dexter D., Clark J.B., Jenner P., Marsden C.D.: Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.*, 1990; 54: 823–827
- [46] Simpkins J.W., Dykens J.A.: Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain Res. Rev.*, 2008; 57: 421–430
- [47] Singer C.A., Rogers K.L., Dorosa D.M.: Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport*, 1998; 9: 2565–2568
- [48] Sriram K., Matheson J.M., Benkovic S.A., Miller D.B., Luster M.I., O'Callaghan J.P.: Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF- α . *FASEB J.*, 2006; 20: 670–682
- [49] Strijks E., Kremer J.A., Horstink M.W.: Effects of female sex steroids on Parkinson's disease in postmenopausal women. *Clin. Neuropharmacol.*, 1999; 22: 93–97
- [50] Teixeira C., Reed J.C., Pratt M.A.: Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 proto-oncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 1995; 55: 3902–3907
- [51] Teter B., Harris-White M.E., Frautschy S.A., Cole G.M.: Role of apolipoprotein E and estrogen in mossy fiber sprouting in hippocampal slice cultures. *Neuroscience*, 1999; 91: 1009–1016
- [52] Thomas B., Mohanakumar K.P.: Melatonin protects against oxidative stress caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the mouse nigrostriatum. *J. Pineal. Res.*, 2004; 36: 25–32
- [53] Toran-Allerand C.D.: Mechanisms of estrogen action during neural development: mediation by interactions with the neurotrophins and their receptors? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 1996; 56: 169–178
- [54] Tsang A.H., Chung K.K.: Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 2009; 1792: 643–650
- [55] Tsang K.L., Ho S.L., Lo S.K.: Estrogen improves motor disability in parkinsonian postmenopausal women with motor fluctuations. *Neurology*, 2000; 54: 2292–2298
- [56] Van Den Eeden S.K., Tanner C.M., Bernstein A.L., Fross R.D., Leimpeper A., Bloch D.A., Nelson L.M.: Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am. J. Epidemiol.*, 2003; 157: 1015–1022
- [57] Weaver C.E.Jr, Park-Chung M., Gibbs T.T., Farb D.H.: 17-beta-Estradiol protects against NMDA-induced excitotoxicity by direct inhibition of NMDA receptors. *Brain Res.*, 1997; 761: 338–341
- [58] Witek A.: Nowy receptor estrogenowy – szansa na bardziej swoiste i bezpieczne leczenie w endokrynologii ginekologicznej? *Ginekol. Pol.*, 2000; 71(2): 98–106
- [59] Witek A.: Receptor estrogenowy – nadrodzina steroidowa – tarczycowego receptora hormonalnego. *Ginekol. Pol.*, 2000; 71(2): 92–97
- [60] Wooten G.F., Currie L.J., Bovbjerg V.E., Lee J.K., Patrie J.: Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 2004; 75: 637–639
- [61] Yaffe K., Krueger K., Cummings S.R., Blackwell T., Henderson V.W., Sarkar S., Ensrud K., Grady D.: Effect of raloxifene on prevention of dementia and cognitive impairment in older women: the Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) randomized trial. *Am. J. Psychiatry*, 2005; 162: 683–690

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.