

AUTOREFERAT

dr Ibeth Guevara-Lora

Zakład Biochemii Analitycznej
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Kraków, wrzesień 2014

1. Imię i Nazwisko

Ibeth Guevara-Lora

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

- magister chemii, 1985r., Wydział Chemii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków. Tytuł pracy magisterskiej: „*Rola reszt argininy w oddziaływaniu ryboflawiny ze specyficznym białkiem wiążącym z jaja kurzego*”
- doktor nauk przyrodniczych w zakresie biologii, 1992r., Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Jagielloński, Kraków. Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Dostępność reszt tryptofanu w białku wiążącym ryboflawinę i w jego kompleksach z flawinami*”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

- Zakład Diagnostyki, Szpital Uniwersytecki w Krakowie, 1990 r.-1993 r.
- Zakład Biochemii Klinicznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, 1993 r.-2000 r.
- Zakład Biochemii Analitycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński, od 2000 r. do 2006 r. – asystent, od 2006 r. do chwili obecnej – adiunkt.

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Osiągnięcia naukowe, stanowiące podstawę do złożenia przeze mnie wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego, stanowi cykl sześciu prac opublikowanych w latach 2009-2014 a przedstawionych tu pod tytułem:

Aktywacja układu generacji kinin w tkankach ludzkich i wpływ kinin na reakcje komórkowe w stanach zapalnych

b) Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe (autor/autorzy, tytuł publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa)

Mój udział w wykonaniu wskazanych publikacji został określony w załączniku nr 4, a oświadczenia współautorów znajdują się w załączniku nr 6. Natomiast kopie prac zostały zebrane w załączniku nr 5. Współczynnik IF został podany zgodnie z rokiem opublikowania. Punktacja MNiSW według komunikatu z dn. 20 grudnia 2012 r.

H1. Guevara-Lora Ibeth[✉], Florkowska Magdalena, Kozik Andrzej (2009) Bradykinin-related peptides up-regulate the expression of kinin B1 and B2 receptor genes in human promonocytic cell line U937. *Acta Biochim Pol* 56, 515-522.

IF = 1,262 Pkt MNiSW – 15

H2. Guevara-Lora Ibeth[✉], Majkucinska Magdalena, Barbasz Anna, Faussner Alexander, Kozik Andrzej (2011) Kinin generation from exogenous kininogens at the surface of retinoic acid-differentiated human neuroblastoma IMR-32 cells after stimulation with interferon- γ . *Peptides* 32, 1193-1200.

IF = 2,434 Pkt MNiSW – 25

H3. Guevara-Lora Ibeth[✉], Labeledz Anna, Skrzeczynska-Moncznik Joanna, Kozik Andrzej (2011) Bradykinin and des-Arg¹⁰-kallidin enhance the adhesion of polymorphonuclear leukocytes to extracellular matrix proteins and endothelial cells. *Cell Commun Adhes* 18, 67-71.

IF = 1,176 Pkt MNiSW – 20

H4. Guevara-Lora Ibeth[✉] (2012) Kinin-mediated inflammation in neurodegenerative disorders. *Neurochem Int* 61, 72-78.

IF = 2,659 Pkt MNiSW – 25

H5. Guevara-Lora Ibeth[✉], Blonska Beata, Faussner Alexander, Kozik Andrzej (2013) Kinin-generating cellular model obtained from human glioblastoma cell line U-373. *Acta Biochim Pol* 60, 299-305.

IF = 1,389 Pkt MNiSW – 15

H6. Guevara-Lora Ibeth[✉], Stalinska Krystyna, Augustynek Bartłomiej, Labeledz-Maslowska Anna (2014) Influence of kinin peptides on monocyte-endothelial cell adhesion. *J Cell Biochem* 115, 1985-1995. (doi. 10.1002/jcb.24870).

IF = 3,368 (2013) Pkt MNiSW – 25

[✉] - autor korespondencyjny

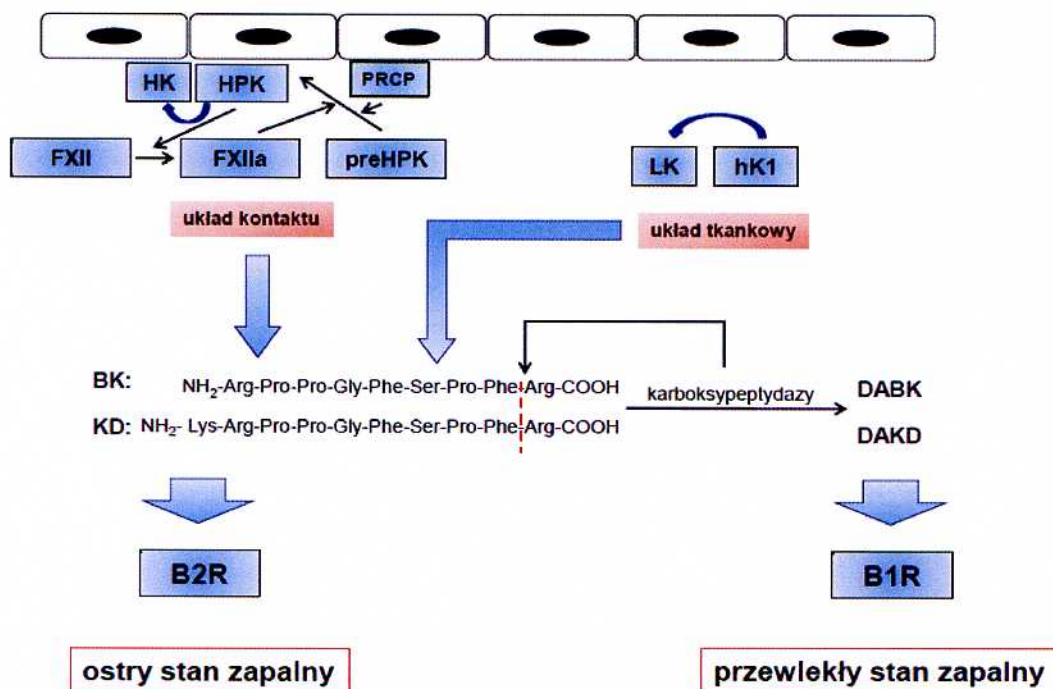
Suma wartości IF prac stanowiących podstawę do habilitacji równa się **12,288**.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

I. Wprowadzenie i cel podjętych badań

Kininy, silnie bioaktywne peptydy wszechobecne w płynach ustrojowych i tkankach, biorą udział w wielu procesach fizjologicznych, między innymi w regulacji ciśnienia tętniczego krwi oraz w transporcie elektrolitów i glukozy. Niemniej jednak kininy i ich metabolity mogą również odgrywać znaczącą rolę w licznych stanach patologicznych, takich jak nadciśnienie tętnicze, niewydolność nerek, kancerogeneza czy neurodegeneracja. Te znane prozapalne substancje są dynamicznie produkowane i degradowane zarówno w warunkach fizjologicznych na ścianie naczyń krwionośnych jak i lokalnie, w uszkodzonych tkankach czy podczas infekcji. Kininy, w tym bradykinina (BK) i kalidyna (KD), są wytwarzane z białek prekursorowych, wielko- i drobnocząsteczkowego kininogenu (odpowiednio HK i LK), przy udziale osoczowej kalikreiny (HPK) lub tkankowej kalikreiny (hK1) [1, 2] (Ryc. 1). Aktywacja enzymatycznej kaskady, wytwarzającej peptydy kininowe na powierzchni komórek śródbłonna, była obiektem wielu badań [2, 3]. Aby zainicjować tę aktywację, trzy białka (w tym HK, czynnik krzepnięcia XII (FXII) i prekalikreina osoczowa (preHPK)) muszą związać się ze specyficznymi receptorami błonowymi, znajdującymi się na powierzchni komórek śródbłonna, układając się w wielobiałkowy kompleks. Kompleks ten określany jest jako układ kontaktu. Pierwszą reakcją tego mechanizmu jest zamiana nieaktywnego FXII w jego aktywną formę (FXIIa). Następnie prekalikreina osoczowa, która krąży z krwią jako kompleks z HK, łączy się z FXIIa, i taki kompleks wiąże się z powierzchnią komórkową, ustawiając się w optymalnej przestrzennej konformacji dla przekształcenia preHPK w aktywną kalikreinę (HPK). HPK uwalnia bradykininę, ale także aktywuje następne cząsteczki FXII, które mogą ponownie uruchomić cały

mechanizm. W ten sposób układ kontaktu działa jako pętla autoregulująca produkcję kinin i krzepnięcie krwi.



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie dróg generacji peptydów kininowych oraz ich rozpoznania przez swoje receptory. B1R – receptor kininowy typu 1, B2R – receptor kininowy typu 2, DABK – des-Arg⁹-bradykinina, DAKD – des-Arg¹⁰-kalidyna, PRCP – propylokarboksypeptydaza

W latach 90. zanotowano wzrost zainteresowania wytwarzaniem kinin przez komórki inne niż endotelialne. Nasza grupa badawcza (zespół prof. Andrzeja Kozika w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego) już wtedy rozpoczęła badania dotyczące generacji kinin przez enzymy proteolityczne pochodzące z komórek fagocytarnych (komórki tuczne, neutrofile, makrofagi) [4-7]. Wobec tego, mając na uwadze istniejące luki w dotychczasowej wiedzy dotyczącej generacji kinin, zdecydowałam się przeprowadzić badania mające na celu poszerzenie tej wiedzy o interesujące fakty związane z produkcją peptydów kininowych przez komórki różnych tkanek ludzkich i zwierzęcych oraz z wpływem owych peptydów na odpowiedź zapalną tych komórek. Wyniki tych badań zostały podsumowane poniżej.

II. Uzyskane wyniki badań opublikowane w pracach wskazanych do postępowania habilitacyjnego na tle aktualnych badań

Ila. Produkcja kinin w różnych modelach komórkowych

Wyniki uzyskane z badań naszej grupy badawczej, dotyczących produkcji peptydów kininowych przez komórki fagocytarne zmotywowały mnie do szukania nowych sposobów wytwarzania kinin, szczególnie w tkankach, gdzie mogą one przyczyniać się do rozwoju stanu zapalnego. W związku z tym, rozpoczęłam badania nad wiązaniem kininogenu z powierzchnią różnych komórek, sprawdzając równocześnie czy następuje degradacja tego białka oraz produkcja kinin. Dwa artykuły, wliczone do osiągnięcia stanowiącego podstawę niniejszego postępowania habilitacyjnego, dotyczą wiązania kininogenów przez dwa modele komórek nerwowych, utworzonych z linii komórkowych nerwiaka zarodkowego IMR-32 oraz z linii komórkowej glejaka wielopostaciowego U-373; w tych modelach badałam również produkcję kinin z egzogenego kininogenu (**H2, H5**). Hipoteza o możliwości generacji kinin przez tkanki nerwowe jest dość prawdopodobna i poparta licznymi doniesieniami, które udokumentowały obecność wszystkich składników potrzebnych do wytwarzania kinin w tkankach nerwowych [8]. Ponadto, wykazano, iż peptydy kininowe są zaangażowane w liczne procesy fizjologiczne i patologiczne w centralnym i obwodowym układzie nerwowym. Z tego powodu w naszych badaniach staraliśmy się dociec, jakie mechanizmy mogą zostać uruchomione aby kininy mogły być uwalniane w tkankach nerwowych. W pierwszej pracy wykorzystaliśmy ludzką linię komórek nerwiaka zarodkowego IMR-32, która po różnicowaniu kwasem retinowym została przekształcona w dojrzałe komórki neuronalne, wykazujące zahamowanie proliferacji, zwiększoną adhezję do podłoża oraz wzrost neurytów. Stwierdzono, że komórki te są w stanie generować niewielkie ilości kinin z egzogenego kininogenu. Jeden z mechanizmów produkcji kinin przez te komórki okazał się być podobny do obserwowanego dla innych typów komórek i wymagał dodatkowego zewnętrznego dostarczenia pozostałych składników układu kontaktu (FXII, preHPK), które zaadsorbowane wspólnie z HK na powierzchni komórek mogły wygenerować HPK i uwalniać kininy z kininogenu. Inny, bardziej autonomiczny mechanizm wymagał tylko egzogenego dodania kininogenów, LK albo HK. Mechanizm ten był zależny od endogennej ekspresji i wydzielania tkankowej kalikreiny przez te komórki.

Komórki neuronalne przedstawiały porównywalną zdolność do wiązania obu typów kininogenu. Wartości stałych dysocjacji dla wiązania HK i LK były podobne,

odpowiednio równe 25 nM i 6 nM. Niektóre białka, takie jak cytokeratyna-1, gC1qR, uPAR, czy proteoglikany zawierające siarczany chondroityny lub siarczany heparanu, wskazane wcześniej jako receptory dla kininogenu na błonie plazmatycznej licznych komórek, znajdują się również na powierzchni komórek neuronalnych [2, 3, 9]. Wydaje się więc bardzo prawdopodobne, że mogą one być zaangażowane w wiązanie kininogenu. W tkankach układu nerwowego podczas procesów zapalnych lub apoptotycznych zauważono wzrost stężenia cytokin. Wybraliśmy jedną z ważnych cytokin w układzie nerwowym, interferon- γ (INF- γ), w celu aktywacji modelu komórkowego; cytokina ta powoduje wzrost produkcji kaspaz lub β -amyloidu w komórkach z tkanek nerwowych [10]. W naszych badaniach sprawdzaliśmy obecność składników zaangażowanych w generację kinin, przed i po stymulacji komórek INF- γ . Komórki neuronalne charakteryzowały się wysoką ekspresją prolylokarboksypeptydazy (PRCP), jednego z enzymów biorących udział w aktywacji prekalikreiny na powierzchniach komórek [2], przy czym ekspresja tego enzymu okazała się niezależna od stymulacji INF- γ . Przeciwnie, słaba ekspresja mRNA preHPK, zaobserwowana w wybranym modelu komórkowym, była silnie stymulowana przez cytokinę. Te obserwacje dowiodły, że badane komórki posiadają źródła enzymów potrzebnych do uruchamiania osocznego układu generacji kinin. Sprawdzone również ekspresję hK1, kininogenazy obficie występującej w uszkodzonych tkankach, będącej dobrym kandydatem na proteinazę zdolną do hydrolizy egzogenego kininogenu. Ekspresja tego enzymu została potwierdzona w neuronalnych komórkach, zarówno na poziomie genu, jak i białka. Ponadto, ekspresja ta znacząco wzrosła po stymulacji komórek INF- γ . W związku z tym, produkcja peptydów kininowych przez komórki nerwowe wydaje się jeszcze bardziej prawdopodobna, zwłaszcza jeśli komórki są aktywowane przez cytokiny. W rzeczywistości, tak jak oczekiwano, udało nam się pokazać generację kinin, których stężenie zostało oznaczone techniką ELISA. Ilość generowanych peptydów była niska w zakresie nanomolowego stężenia, niemniej jednak wyższe stężenia kinin uzyskano zarówno z HK, jak również z LK, gdy komórki były wcześniej aktywowane cytokiną, przy czym LK okazał się być bardziej wydajnym prekursorem. Do ustalenia, czy zachodzi aktywacja układu kontaktu na błonie komórek neuronalnych, zastosowano różne kombinacje białek zaangażowanych w produkcję kinin (HK, preHPK nad FXIIa) do inkubacji z komórkami neuronalnymi. Badania te udowodniły bezdyskusyjnie uruchomienie układu kontaktu na powierzchni tych

komórek przy zastosowaniu kombinacji FXIIa/HK/preHPK i założeniu, że te białka utworzą kompleks.

Zastosowanie innej techniki (radiokompetycyjny test do badania wiązania liganda do receptora) umożliwiło pomiar stężenia metabolitów kinin, które nie posiadają reszty argininy na C-końcu łańcucha peptydu. Substancje te, zwane des-Arg kininami, mogą powstawać z kinin poprzez działanie specyficznych kininaz, m.in. karboksypeptydazy typu M i typu N [1, 3]. Karboksypeptydazy mogą regulować degradację kinin we krwi i w tkankach tylko w niewielkim stopniu, ale wytwarzane przez nie metabolity odgrywają ważną rolę w procesach patologicznych zarówno układu krwionośnego, jak i w innych tkankach. Uwolnione kininy i des-Arg kininy rozpoznawane są przez dwa różne typy receptorów należących do rodziny GPCR: receptor typu 1 i 2 (odpowiednio, B1R i B2R). Pierwszy typ najlepiej wiąże des-Arg metabolity podczas gdy drugi typ rozpoznaje przede wszystkim BK i KD [1, 11]. Zasadnicza różnica funkcji kinin i ich des-Arg metabolitów opiera się na strukturze i regulacji ekspresji tych receptorów. Receptory B2 występują powszechnie w wielu komórkach i są odpowiedzialne za większość fizjologicznych funkcji kinin. Natomiast ekspresja B1R jest na ogół indukowana, zwłaszcza przez liczne bodźce zapalne [11]. W przypadku wykorzystanego w naszych badaniach modelu komórek neuronalnych zauważyliśmy wysoką ekspresję karboksypeptydazy M (CPM), co mogło być wynikiem działania interferonu γ . Oprócz tego, na tym modelu wykazaliśmy możliwość zamiany kinin w ich des-Arg metabolity przez te komórki.

Wobec powyższych faktów, wyniki uzyskane w trakcie naszych badań pozwoliły domniemywać istnienie nowego mechanizmu produkcji kinin w komórkach nerwowych, w których peptydy te mogą być generowane z egzogennych kininogenów, zarówno przez aktywację układu kontaktu jak i inną drogą, niezależną od procesów na powierzchni komórek, z udziałem hK1. Produkcja ta jest zależna od obecności cytokin co sugeruje, że powstałe kininy i ich uzyskane des-Arg metabolity mogą przyczyniać się do przedłużenia odpowiedzi zapalnej. W konsekwencji, przez powstawanie przewlekłego stanu zapalnego w tkankach nerwowych mogą pojawiać się dalsze zaburzenia, prowadzące do wystąpienia wielu chorób.

W kolejnej publikacji badałam również produkcję kinin przez inny model komórkowy z układu nerwowego, ale w odmiennym kontekście [H5]. Liczne badania kliniczne udokumentowały, że kininy występują obficie w tkankach i płynach fizjologicznych pacjentów z chorobą nowotworową [12]. Peptydy te biorą udział

w rozwoju nowotworu, przyczyniając się do zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych, co w konsekwencji przyspiesza migrację i rozrost komórek nowotworowych. Z drugiej strony, wykazano, że pojawienie się zmian nowotworowych oraz ich złośliwa progresja związane są z równoczesnym występowaniem procesów prozapalnych [13]. Mając na uwadze, że kininy są silnymi mediatorami stanu zapalnego, a także że ich des-Arg metabolity wzmagają przewlekłe stany zapalne, badania zmierzające do udowodnienia produkcji tych peptydów bezpośrednio przez komórki nowotworowe mogą być pomocne dla wyjaśnienia procesu rozwoju nowotworu. Do tych badań wybrano ludzką linię komórek glejaka U-373. Komórki te były stymulowane czynnikiem martwicy nowotworów α (TNF- α), w celu zbadania produkcji kinin w nowotworowym modelu komórkowym symulującym stan zapalny. W tych badaniach udało nam się wykazać silne wiązanie kininogenu do powierzchni komórek, a obliczona stała dysocjacji dla tego wiązania była w zakresie nanomolowego stężenia, porównywalnym do wartości dla innych komórek z układu nerwowego [9, H2]. Ponadto, pokazano degradację kininogenu zależną od czasu jego inkubacji z komórkami oraz od stymulacji cytokiną. Degradacja ta prowadziła do uwolnienia polipeptydów, rozpoznawanych przez swoiste przeciwciała przeciw ciężkim i lekkim łańcuchom HK. Obserwacje te potwierdziły przypuszczenia, iż komórki nowotworowe mogą wytwarzać kininy. Rzeczywiście, badany model komórkowy był zdolny do produkcji tych peptydów z egzogenego HK. W tym przypadku uzyskana zawartość kininy była dość niska, podczas gdy produkcja des-Arg kinin bardziej obfita. Ponadto, drugie z wymienionych peptydów wykazały się większą stabilnością. W naszych badaniach zaobserwowano silną aktywność karboksypeptydaz w komórkach glejaka, która była niezależna od stymulacji cytokiną. Znaczną ilość des-Arg¹⁰-kalidyny (DAKD) uzyskano z kalidyny, co wskazywało, iż duża ilość kinin generowanych z egzogenego HK może zostać przekształcona w des-Arg metabolity. Faktycznie, udało nam się zmierzyć stężenia zarówno kinin jak i des-Arg kinin po inkubacji HK z komórkami glejaka, a wartości te znalazły się w zakresie uznawanym za patologiczny [1]. Badano również ekspresję białek niezbędnych do generacji kinin. Wyniki wykazały wysoką ekspresję kininogenu w badanych komórkach, który może stanowić źródło prekursorów do produkcji kinin przez inne komórki układu nerwowego. Podobnie jak w przypadku komórek neuronalnych, możemy zaproponować aktywację układu kontaktu jako drogę powstawania kinin, bowiem w komórkach glejaka odkryto wysoką ekspresję enzymów preHPK i PRCP, która była zależna od stymulacji TNF- α . Zgodnie z oczekiwaniami,

w tym modelu komórkowym zarejestrowaliśmy wysoką ekspresję mRNA dla tkankowej kalikreiny, która była nasilana przez cytokinę. Wobec powyższych obserwacji można postulować, iż w obu modelach komórkowych mogą występować te same szlaki produkcji kininy. Oprócz tego, w naszych badaniach pokazaliśmy po raz pierwszy, że komórki nowotworowe mogą produkować kininy po stymulacji cytokinami. Te kininy, z kolei, mogą przekształcić się w bardziej stabilne peptydy, des-Arg kininy, prowadząc do lokalnego wzrostu stężenia aktywnych peptydów w tkankach nowotworowych.

Podsumowując, w trakcie tych badań przyczyniłam się do wzbogacenia stanu wiedzy o kolejne nowe fakty dotyczące generowania kinin przez ludzkie komórki, w których rozwój stanu zapalnego może powodować powstawanie lub pogłębienie wielu chorób.

IIB. Ekspresja i regulacja specyficznych receptorów kininowych w wybranych modelach komórkowych

Zgodnie z tym, co zostało stwierdzone wyżej, peptydy kininowe działają poprzez specyficzne receptory B1R oraz B2R. Ten ostatni receptor przekazuje sygnał przede wszystkim przez $G_q\alpha$, ale nie wykluczono interakcji z innymi białkami G, np. $G_i\alpha$, $G_s\alpha$ i $G\alpha_{12/13}$ [11]. Ścieżka prowadząca poprzez $G_q\alpha$ inicjuje kaskadę przekazywania sygnału przez fosfolipazy C, co prowadzi do powstawania inozytolo-3-fosforanu, mobilizacji wewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} , produkcji tlenu azotu oraz aktywacji kinazy białkowej C. Inne drogi sygnalizacji B2R, związane z fosfolipazą A_2 , powodują uwolnienie kwasu arachidonowego, który z kolei wzmaga produkcję prostaglandyn i tlenu azotu oraz aktywację innych enzymów, m.in. fosfolipazy D. Bradykinina aktywuje również szereg innych czynników transkrypcji, które regulują indukcję cytokin, takich jak interleukiny 1β (IL- 1β), TNF- α i innych. Drugi receptor, B1R, przekazuje sygnał poprzez $G_q\alpha$ i $G_i\alpha$ aktywując przy tym wiele ze ścieżek sygnalizacyjnych dla B2R. Biorąc pod uwagę fakt, że oba receptory są zaangażowane w podobne ścieżki sygnalizacyjne, różnica w funkcjach przez nie wykonywanych wydaje się być związana ze sposobem wyciszania sygnału; dotyczy to, przynajmniej częściowo, odmiennego sposobu desensytacji i internalizacji receptorów kininowych. Z tego też powodu, ostra faza procesu zapalnego jest przypisywana głównie działaniu B2R, który może szybko ulec desensytacji, natomiast przewlekły stan zapalny jest przede wszystkim przypisywany działaniu B1R, który ulega jej tylko częściowo.

Ponadto, B2R ulega internalizacji wewnątrz komórek razem z agonistą, regulując tym samym jego obecność na powierzchni komórek, podczas gdy B1R ulega tylko częściowej internalizacji w odpowiedzi na agonistów. W wyżej opisanych publikacjach badano również ekspresję receptorów kinin w wybranych modelach komórkowych [H2, H5]. Badania prowadzone na komórkach neuronalnych pozwoliły zaobserwować regulację receptorów kininowych, wywoływaną przez INF- γ . Wpływ tej cytokiny na indukcję receptora B1 był wyraźniejszy aniżeli receptora B2. Wiadomo, że nasilona indukcja ekspresji B2R może wywołać zwiększone wydzielanie cytokin, które z kolei intensyfikują ekspresję B1R [11, 14]. Zakładamy zatem, iż wyniki uzyskane w badaniach nad ekspresją receptorów kininowych w komórkach neuronalnych mogą być rezultatem takich oddziaływań. Doświadczenia z użyciem ludzkiej linii komórek glijaka doprowadziły do podobnych wyników; zaobserwowano również zwiększoną ekspresję B1R pod wpływem cytokiny, w tym przypadku TNF- α . Wzrost ten jest znaczny w porównaniu z indukcją ekspresji B2R wywołaną przez tę cytokinę. W oparciu o te wyniki możemy zatem wnioskować, że w komórkach układu nerwowego, podczas urazu lub infekcji, kiedy cytokiny występują w obfitości, może być generowana zwiększona ilość kinin oraz ich des-Arg metabolitów, które wspólnie z cytokinami wywołują zwiększoną ekspresję ich receptorów, szczególnie B1R. Efekty te mogą skutkować rozprzestrzenianiem się stanu zapalnego w tkankach nerwowych. Istotnie, w ostatnich latach pojawia się coraz większa liczba doniesień wskazujących na udział kinin w różnych zaburzeniach neurologicznych, w których równocześnie występują procesy zapalne. Niedawno zestawiałam w artykule przeglądowym najbardziej znaczące i najnowsze osiągnięcia nurtu badań, dotyczących roli peptydów kininowych w reakcji zapalnej w tkankach nerwowych, ze szczególnym naciskiem na procesy apoptotyczne, pojawiające się w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona czy inne [H4]. Pojawieniu się reakcji zapalnej w centralnym i ośrodkowym układzie nerwowym podczas urazu, bólu lub zakażenia, towarzyszy uwolnienie prozapalnych mediatorów, takich jak cytokiny, ikozanoidy czy wolne rodniki, powodując zwiększenie przepuszczalności naturalnych barier znajdujących się w układzie nerwowym [15, 16]. Istnieją liczne dowody na pośrednictwo kinin w zaburzeniach prowadzących do pogłębienia stanu zapalnego w tkankach nerwowych. Do nich zalicza się właśnie zniszczenie bariery krew-mózg, co powoduje obrzęk mózgu i swobodny transport prozapalnych mediatorów. Badania nad ekspresją receptorów kinin w komórkach układu nerwowego oraz nad funkcją, jaką

spełniają te peptydy są ciągle prowadzone zarówno na modelach komórkowych, jak i zwierzęcych. Wyniki tych badań często prowadzą jednak do niejednoznacznych wniosków. Na przykład, badania przy użyciu antagonistów B2R ujawniły wiodącą rolę tego receptora we wczesnej reakcji zapalnej w niedokrwieniu tkanek nerwowych [17], podczas gdy badania wykonywane na ludzkich komórkach śródbłonkowych z naczyń krwionośnych mózgu wykazały, że obrzęk i wydzielanie cytokin może być hamowane przez zablokowanie receptora B1 [18]. Pojawienie się w literaturze niejednoznacznych wyników odnośnie roli receptorów kininowych w kontrolowaniu procesów zapalnych może być związane z możliwością wzajemnej regulacji tych receptorów przez swoich agonistów. W jednej z publikacji wchodzących w skład osiągnięcia, stanowiącego podstawę niniejszego postępowania habilitacyjnego, zaproponowaliśmy właśnie autoregulację obu receptorów kininowych przez ich specyficznych agonistów [H1]. Wcześniej, do podobnego wniosku doszła grupa Phagoo, ale tylko odnośnie regulacji BR1 przez agonistów B2R w obecności cytokin [19]. W badaniach opisanych w tej publikacji korzystaliśmy z ludzkiej linii komórek promonocytarnych U937 do oceny ekspresji receptorów kinin po stymulacji IL-1 β , BK i DAKD. Tak jak oczekiwano, mRNA receptora B2R był obecny w komórkach promonocytarnych przed stymulacją, natomiast jego ekspresja, podobnie jak i ekspresja B1R, była indukowana przez cytokinę IL-1 β . Ponadto, tak jak w badaniach prowadzonych przez grupę Phagoo, obserwowano regulację ekspresji B1R przez bradykininę. Jednak najbardziej znaczący wniosek płynący z naszej pracy, odnotowany po raz pierwszy, dotyczył regulacji ekspresji B2R przez des-Arg kininy. Niedawno pokazano podobną regulację w komórkach śródbłonka ze zwiększoną ekspresją receptora B1R, podchodzących od szczurów [20].

Podsumowując tę część moich badań, można stwierdzić, iż przyczyniły się one do ustalenia nowych faktów dotyczących regulacji receptorów kininowych, które mogą być pomocne w kontroli licznych zaburzeń, przy użyciu specyficznych antagonistów. Stosowanie takich substancji jest aktualnie obiektem intensywnych badań w różnorodnych stanach patologicznych, regulowanych przez kininy [21, 22]. Badania te dostarczają interesujących wyników, które mogą pomóc w farmaceutycznej manipulacji receptorami kininowymi w leczeniu wielu chorób związanych z przewlekłą odpowiedzią zapalną.

IIc. Efekty wywoływane przez peptydy kininowe w wybranych modelach komórkowych w kontekście stanu zapalnego

Wydaje się, iż kluczowa rola kinin i ich metabolitów w różnych chorobach jest związana z ich pośrednictwem w powstawaniu ostrego i przewlekłego stanu zapalnego. Z jednej strony istnieją liczne doniesienia o uwalnianiu cytokin przez różnorodne komórki pod wpływem peptydów kininowych [23-25]. Z drugiej strony, wykazano, również w naszych badaniach, że cytokiny są w stanie wywołać produkcję kinin przez różne typy komórek i, co najważniejsze, że peptydy te mogły zostać przekształcone w bardziej stabilne metabolity, des-Arg kininy, które promują przewlekły stan zapalny [7, H2, H5]. Można zatem twierdzić, iż nie tylko miejscowa ale i ogólnoustrojowa produkcja kinin musi być pod ścisłą kontrolą, bowiem nieznaczne zaburzenia w ich prawidłowej degradacji mogą doprowadzić do potęgowania procesów zapalnych. Wiodącą rolę w degradacji kinin odgrywają kininazy, wśród nich enzym konwertujący angiotensynę, endopeptydaza obojętna 24.11 oraz aminopeptydaza P. Niemniej jednak, w osoczu i na powierzchni komórek znajdują się liczne karboksypeptydazy, które przy braku równowagi w degradacji kinin mogą produkować des-Arg kininy. W naszych badaniach aktywności karboksypeptydaz, przypisywano im odpowiedzialność za produkcję tych peptydów, bowiem specyficzne inhibitory tych enzymów blokowały powstawanie peptydów. W oparciu o powyższe fakty oraz o zaobserwowaną wzmoczoną ekspresję receptora B1, możemy zatem potwierdzić, że w badanych przez nas modelach komórkowych ostra odpowiedź zapalna wywołwana cytokinami przechodzi w stan chroniczny, który może doprowadzić do powstawania patologicznych procesów w tkankach i układzie krążenia. Podczas wieloetapowego procesu celowego kierowania fagocytów do miejsca infekcji lub uszkodzenia, na początku zachodzi migracja i adhezja komórek fagocytarnych do ściany naczyń krwionośnych. Aktywacja tych procesów przez cytokiny jest dobrze opisana [26]. Mimo licznych dowodów wpływu kinin na migrację leukocytów [27, 28], działanie tych peptydów na procesy adhezyjne jest słabo zbadane. Można przypuszczać, że peptydy kininowe powodują zwiększoną migrację leukocytów doprowadzając do powstawania przewlekłego stanu zapalnego. Jednak stan ten może zachodzić nie tylko z powodu zwiększonej przepuszczalności naczyń krwionośnych ale także, ponieważ kininy mogą pośredniczyć w adhezji leukocytów do ściany naczyń. Badania prowadzone przeze mnie potwierdziły te sugestie, udowadniając zwiększenie adhezji leukocytów, zarówno neutrofilii (PMN) jak i monocytów, do białek macierzy zewnątrzkomórkowej i do komórek śródbłonna [H3,

H6] Ponadto zaproponowaliśmy po raz pierwszy ważną rolę receptora B1 w tych procesach. W badaniach wykazano również wzrost adhezji neutrofilii do fibrynogenu (FBR) i fibronektyny (FBN) pod wpływem bradykininy oraz głównego agonisty B1R (DAKD), jednak komórki te, stymulowane przez kininy, wykazały silniejszą adhezję do komórek śródbłonka niż do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, zwłaszcza, gdy komórki były wcześniej stymulowane IL-1 β . Jednocześnie, zaobserwowano zmiany w ekspresji podjednostek integryny Mac-1 (CD11b i CD18) po wpływie BK i DAKD jak i po stymulacji komórek IL-1 β . Te wyniki dowodziły udziału kinin w interakcji pomiędzy komórkami, która może być czynnikiem przyspieszającym rozwój przewlekłych chorób zapalnych. Podobne efekty wywołane przez kininy zaobserwowano w drugim modelu doświadczalnym, czyli w komórkach monocytarnych, które również silnie przylegały do FBN i do komórek śródbłonka po inkubacji z BK i DAKD **[H6]**. Ponadto, w tej publikacji pokazaliśmy wpływ tych peptydów na wzrost ekspresji adhezyjnej cząsteczki ICAM-1 w komórkach śródbłonka oraz integryny Mac-1 w monocytach. Można więc wnioskować, że peptydy kininowe mogą mieć wpływ na procesy adhezyjne poprzez aktywację nie tylko leukocytów, ale także komórek śródbłonka. Interesujące wyniki uzyskane w tych badaniach dotyczyły zahamowania indukowanej przez BK adhezji leukocytów do komórek endotelialnych za pomocą swoistego inhibitora karboksypeptydaz, co sugeruje decydujący wpływ des-Arg peptydów w procesach adhezyjnych. Biorąc pod uwagę, że receptor B1 był silnie indukowany przez cytokiny, takie jak INF- γ , IL-1 β lub TNF- α **[H3, H5, H6]**, a w dodatku, jak zostało wcześniej opisane, że agoniści B2R mogą również wywoływać ekspresję receptora B1 **[H1]**, można uznać ten receptor za dominujący typ w wywoływanej przez kininy mediacji adhezji leukocytów do ściany naczyń krwionośnych.

Konkluzje naszych badań, dotyczących skutków działania peptydów kininowych, skłoniły nas do sprawdzenia możliwości zbieżności ścieżek sygnalizacyjnych receptorów kininowych oraz tych promujących procesy zapalne. Jednym z czynników transkrypcyjnych o szerokim znaczeniu w odpowiedzi komórkowej na stan zapalny oraz stres oksydacyjny jest jądrowy czynnik κ B (NF- κ B) [29]. W istocie, szlak NF- κ B jest aktywowany nie tylko przez cytokiny, ale również przez des-Arg kalidynę [30]. Ponadto, wiadomo, że promotor genu obu receptorów kininowych posiada miejsce wiązania dla kilku czynników transkrypcyjnych, w tym NF- κ B [11]. Aktywacja tego

czynnika koreluje ze zwiększoną ekspresją receptorów B1, co wiąże się z przekształceniem ostrej odpowiedzi zapalnej w jej przewlekły stan [11, 30].

Niemniej jednak, nie można przypisać regulacji ekspresji receptorów kinin oraz procesów zapalnych tylko temu szlakowi. Inne czynniki transkrypcyjne, które są ściśle związane z reakcją zapalną, mogą również być zaangażowane w regulację ekspresji receptorów kinin. Wśród nich kinazy Janus oraz białka należące do rodziny transduktorów sygnału i aktywatorów transkrypcji (STAT) były słabo zbadane w aspekcie ich regulacji przez kininy. Dotychczas opublikowano tylko jedną pracę na ten temat, donoszącą o aktywacji białek STAT przez bradykininę w bydłych komórkach śródbłonna [31]. Mając na uwadze coraz większą liczbę artykułów wskazujących na rolę aktywowanych białek STAT w adhezji komórek [32-34], można założyć, że istnieje duże prawdopodobieństwo, iż te czynniki transkrypcyjne mogą pośredniczyć w procesach adhezyjnych indukowanych przez peptydy kininowe. Istotnie, w prowadzonych przez nas badaniach, odnotowano znaczące zmiany w aktywacji STAT-1 i STAT-3 przez BK i DAKD w komórkach śródbłonna i monocytach [H6]. Wcześniej opisaliśmy nasiloną adhezję monocytów do komórek endotelialnych, która może się wiązać ze wzrostem produkcji ICAM-1 w komórkach śródbłonna; oba te efekty były indukowane przez BK i DAKD. Ekspresja ICAM-1, jednego z głównych białek powierzchniowych komórek endotelialnych biorących udział w adhezji leukocytów, zależna jest od szlaku sygnalizacyjnego białek STAT-1 [26]. Jednak w naszych badaniach, nie zaobserwowano znaczących zmian w aktywacji tej proteiny pod wpływem kinin w komórkach śródbłonna. W związku z tym zasugerowano, iż regulacja ekspresji ICAM-1 przez kininy mogłaby się odbywać pośrednio poprzez szlak NF- κ B lub AP-1, ponieważ udowodniono wcześniej regulację ekspresji tego białka adhezyjnego przez wymienione drogi sygnalizacyjne. Hamowanie efektu BK na adhezję monocytów oraz na produkcję ICAM-1 przy udziale inhibitora karboksypeptydaz mogłoby zatem być zgodne z proponowaną powyżej hipotezą, bowiem agoniści B1R mogą aktywować szlaki AP-1 i NF- κ B. Z drugiej strony, BK i DAKD powodowały aktywację białek STAT-3. Można zatem przypuszczać, że we wzmocnionej adhezji monocytów przez kininy mogą pośredniczyć STAT-3, jako że promotor genu białka ICAM-1 posiada miejsce wiązania dla tego czynnika transkrypcyjnego [35]. Co więcej, regulacja funkcji białek STAT-1 przez STAT-3 była wcześniej postulowana [36], co pozwala wysunąć hipotezę, iż obserwowane efekty wywołane kininami mogą być związane z tego rodzaju regulacją.

Badania grupy Xie wykazały, że spadek aktywności STAT-1 jest związany z mocniejszą adhezją leukocytów wraz z obniżeniem ich migracji. My właśnie zaobserwowaliśmy spadek aktywności STAT-1 w komórkach monocytarnych stymulowanych BK [H6]. Wobec tego, postulujemy, że adhezja indukowana przez BK może być mediowana przez szlak sygnalizacyjny STAT-1 w monocytach. Wyniki uzyskane po użyciu antagonisty receptora B2, HOE-140, popierają tę tezę; substancja owa hamowała zarówno adhezję monocytów jak i znosiła obserwowane zmiany w aktywacji STAT-1. Jednak, w przypadku drugiego peptydu, DAKD, obserwowano odmienny efekt na aktywację STAT-1 w monocytach, przy czym zachowany został efekt peptydu na adhezję komórek do FBN i do komórek śródbłonna. Stosowanie selektywnego antagonisty receptora B1, DHOE-140, do inkubacji monocytów stymulowanych DAKD, spowodowało zniesienie wzmocnionej adhezji, co potwierdziło pośrednictwo tego peptydu. Ostateczna interpretacja tych wyników może się okazać dość skomplikowana i wymagająca głębszych badań, zwłaszcza w zakresie współdziałania ścieżek sygnalizacyjnych. Niemniej jednak, udało nam się wykazać, że BK i DAKD spowodowały istotne zmiany w aktywacji STAT-3 w komórkach monocytarnych. Czynniki te pośredniczy w odpowiedzi zapalnej poprzez zewnętrzne lub wewnętrzne drogi, powodując uwolnienie wielu cytokin i chemokin oraz innych mediatorów stanu zapalnego [37]. Dodatkowo receptory wielu z tych mediatorów mogą dalej aktywować STAT-3. Białko to może zatem odgrywać decydującą rolę w rozprzestrzenianiu się procesów zapalnych przez autokrynną oraz parakrynną pętlę. Poza tym, udowodniono ścisłą współpracę między STAT-3 i NF- κ B podczas propagacji odpowiedzi immunologicznej [38]. Wobec tego, mając na uwadze, że NF- κ B jest czynnikiem transkrypcyjnym promującym adhezję komórek [39], postulujemy, że najprawdopodobniej współpraca pomiędzy nim a STAT-3 może być odpowiedzialna za adhezję monocytów wywoływaną kininami. Podsumowując, w naszych badaniach udało się wykazać, że BK i DAKD indukują adhezję monocytów, zarówno do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, jak i do komórek śródbłonna oraz, że ścieżki sygnalizacyjne białek STAT mogą być zaangażowane w te procesy.

III. Posumowanie osiągnięć naukowych przedstawionych w cyklu prac stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego oraz znaczenie prowadzonych badań

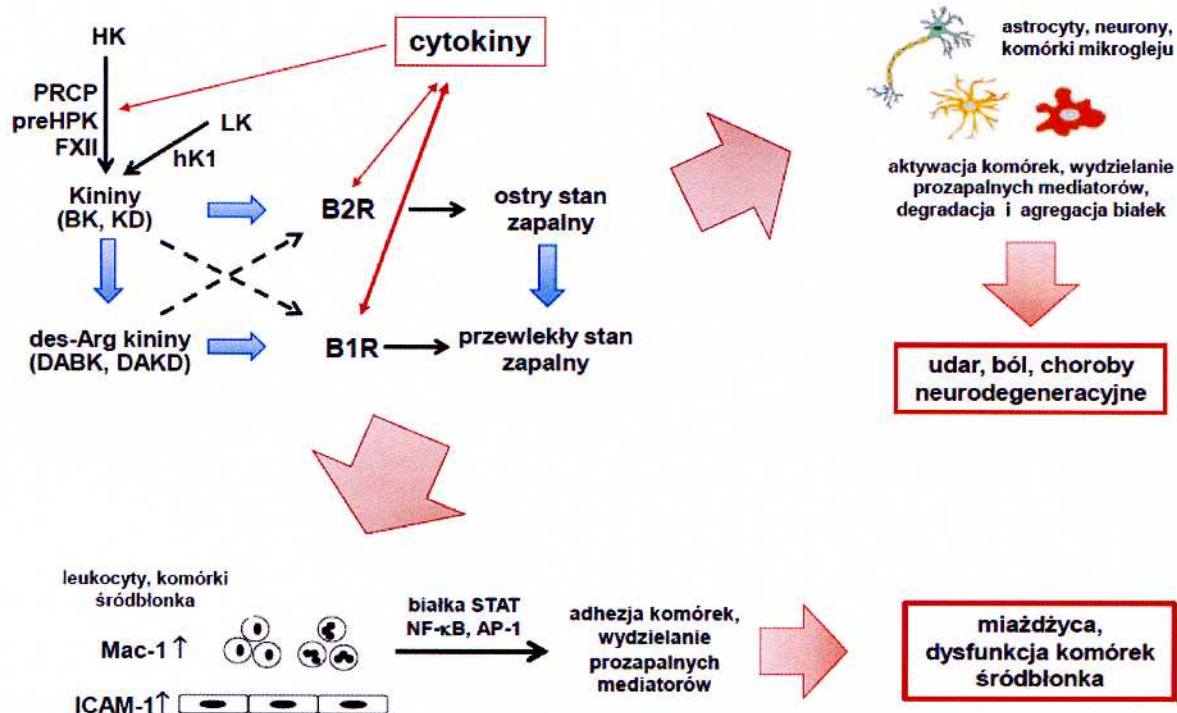
Wyniki uzyskane w publikacjach wyżej opisanych wprowadziły nowe koncepcje w tematyce dotyczącej produkcji kinin przez ludzkie komórki tkanek oraz udziału tych substancji w propagacji przewlekłego stanu zapalnego (Ryc. 2). W szczególności wykazano, że:

1. kininogeny, HK i LK, mogą wiązać się z powierzchnią różnych komórek układu nerwowego; wiązanie to jest specyficzne i zależne od jonów cynku. W moich badaniach wykazano silne wiązanie obu kininogenów zarówno przez komórki neuronalne jak i komórki gleju;
2. komórki te były w stanie wytworzyć peptydy kininowe z egzogenego kininogenu na poziomie nanomolowego stężenia. Generacja kinin była bardziej wydajna przy wstępnej stymulacji komórek cytokinami (INF- γ , TNF- α). W badanych komórkach wykazano ekspresję enzymów potrzebnych do wytwarzania kinin: hK1, preHPK i PCPR. Ekspresja kininogenaz wzrastała również po stymulacji cytokinami. W przypadku komórek neuronalnych, dodanie preHPK i FXIIa spowodowało większą produkcję kinin, sugerując aktywację układu kontaktu na powierzchni tych komórek;
3. aktywność karboksypeptydaz w badanych komórkach była wysoka. Ponadto w przypadku komórek neuronalnych, INF- γ powodował indukcję ekspresji tych peptydaz oraz ich wzmocnioną aktywność. Wykazano również, że komórki użyte w tych badaniach były w stanie produkować des-Arg kininy, zarówno z egzogenych kinin jak i z kininogenu;
4. cytokiny również powodowały wzrost ekspresji receptorów kininowych, zwłaszcza B1R, odpowiedzialnego za przewlekły stan zapalny.

Udało mi się więc wykazać, że tkanki są zdolne do generowania kinin, które w obecności cytokin mogą zostać przekształcone w ich metabolity, czyli des-Arg kininy. Peptydy te mogą przyczynić się do rozprzestrzeniania się stanu zapalnego, ze względu na znacznie zwiększoną ekspresję B1R.

W dalszych badaniach ustalono wpływ peptydów kininowych w klasycznym modelu początkowego stanu zapalnego, czyli w adhezji leukocytów do komórek śródbłonna w ścianie naczyń krwionośnych. W szczególności udowodniłam:

5. obecność receptorów kininowych w komórkach monocytarnych;
6. aktywację tych receptorów przez ich agonistów w komórkach monocytarnych i endotelialnych. Uzyskane wyniki wskazywały na autoregulację receptorów kininowych. Co prawda indukcja ekspresji B1R przez bradykininę była już wcześniej znana, ale indukcja ekspresji B2R przez des-Arg kininy została wykazana po raz pierwszy w naszych badaniach. Dowodzi to znaczenia odpowiedniej równowagi pomiędzy produkcją kinin i ich degradacją przez komórki odpowiedzialne za odpowiedź zapalną;
7. nasiloną adhezję leukocytów, monocytów i granulocytów, stymulowanych kininami do białek macierzy zewnątrzkomórkowej (fibronektyny i fibrynogenu) oraz do komórek śródbłonna. Zastosowanie inhibitora karboksypeptydaz doprowadziło do obniżenia tego efektu, sugerując wiodącą rolę des-Arg metabolitów. Peptydy te mogły być wytwarzane przez leukocyty i przez komórki endotelialne ze względu na obecność karboksypeptydaz w tych komórkach;
8. indukcję ekspresji białek adhezyjnych, takich jak integryna Mac-1 w leukocytach oraz ICAM-1 w komórkach śródbłonna przez peptydy kininowe;
9. zwiększenie ekspresji B1R przez INF- γ w monocytach oraz w komórkach śródbłonna, sugerujące ważną rolę tych receptorów dla interakcji pomiędzy komórkami śródbłonna a leukocytami;
10. pośredni udział białek STAT, czynników transkrypcyjnych zaangażowanych we wrodzoną odpowiedź immunologiczną, w efektach wywołanych przez peptydy kininowe, takich jak wzmocnienie adhezji leukocytów do komórek śródbłonna.



Rycina 2. Schemat podsumowania uzyskanych osiągnięć w tematyce generacji kinin i ich udziału w procesach zapalnych.

Podsumowując (Ryc. 2), można wnioskować że, kininy i ich metabolity mogą, za pośrednictwem swoich receptorów odgrywać kluczową rolę w odpowiedzi immunologicznej. Wzmocniona przez kininy i cytokiny ekspresja B1R w tkankach i w leukocytach może przyczyniać się do przedłużania procesów zapalnych, co prowadzi do rozwoju przewlekłego stanu zapalnego. Obserwacje te mogą być pomocne w badaniach dotyczących możliwej manipulacji farmakologicznej receptorów B1 w celu znalezienia nowych sposobów leczenia wielu chorób związanych ze stanem zapalnym, zwłaszcza takich, gdzie pojawiają się zaburzenia procesów adhezji leukocytów do ścian naczyń. Badania tutaj opisane zostały częściowo wykonane w ramach kierowanego przeze mnie grantu z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N301 067 31/2018.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

Pozostałe osiągnięcia, nie uwzględnione we wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego, obejmują 41 prac, które zostały pogrupowane zgodnie z miejscem ich realizacji. Pierwsza grupa dotyczy prac badawczych związanych z tematyką wyżej opisaną i realizowaną w moim aktualnym miejscu pracy. Druga dotyczy prac badawczych realizowanych w poprzednich miejscach zatrudnienia. Trzecia grupa, to prace badawcze

realizowane w ramach współpracy z innymi jednostkami. Wykaz publikacji obejmujących te osiągnięcia jest przedstawiony w załączniku nr 4.

- a) Przedstawienie osiągnięć uzyskanych podczas mojej pracy w Zakładzie Biochemii Analitycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, które nie zostały włączone do wniosku habilitacyjnego, ale dotyczą podobnej tematyki.

W trakcie mojej kariery zawodowej pracowałam w innych projektach obejmujących tematykę generacji kinin. Były one realizowane w Zakładzie Biochemii Analitycznej pod kierunkiem Prof. A. Kozika. Na początku byłam zaangażowana w badania związane z regulacją produkcji peptydów kininowych przez działanie enzymów proteolitycznych, wydzielanych z neutrofilów. W tych badaniach wykazano proteolizę kininogenów przez ludzką elastazę, w wyniku czego powstały stosunkowo nieduże fragmenty polipeptydowe, które zawierały nienaruszoną wewnętrzną sekwencję aminokwasową bradykininy. Wykazano niezdolność kininogenaz hK1 i HPK do produkcji peptydów kininowych z tych fragmentów kininogenu. Wyniki te pozwoliły postulować znaczącą rolę, jaką może spełniać elastaza neutrofilowa w regulacji stężenia kinin w miejscu stanu zapalnego [5].

Regulacja kaskad uwalniających kininy z prekursorów w ognisku zapalnym nie zależy tylko od działania neutrofilów. Podczas późniejszych badań nasza grupa udowodniła, że kininogen może się wiązać na powierzchni komórek monocytarnych jak i makrofagów, powodując aktywację kaskady generacji kinin. W badaniach tych udokumentowano silne wiązanie HK do białek błonowych znajdujących się na powierzchni komórki, takich jak Mac-1, α 1qR i uPAR. Wyniki te sugerowały, że w tych komórkach kininy są produkowane w podobny sposób jak na powierzchni komórek śródbłonna. Istotnie, nieco później udowodniono znaczącą produkcję kinin z kininogenów przez makrofagi. Te wyniki pozwoliły stwierdzić udział kinin we wtórej odpowiedzi komórek układu odpornościowego, przyczyniając się w ten sposób do dalszego wzmacniania odpowiedzi zapalnej [6].

Inne zagadnienie podjęte przez naszą grupę badawczą dotyczy roli peptydów kininowych w obronie organizmu ludzkiego przed infekcjami grzybiczymi. Dzięki wynikom uzyskanym do tej pory udało się pokazać po raz pierwszy silną adsorpcję kininogenu na powierzchni drożdżaków rodzaju *Candida*. W pracy tej wiązanie HK przez drożdże zostało scharakteryzowane w różnych gatunkach *Candida*, a wyniki pozwoliły wnioskować o korelacji pomiędzy zdolnością wiązania tego białka

a patogennością grzybów z tego rodzaju. W tej pracy udowodniono również zależność wiązania HK od morfologii tych mikroorganizmów – kininogen najsilniej wiązały mocno inwazyjne formy strzępkowe tych grzybów [40].

Dalsze badania pokazały, że adsorpcji kininogenu na powierzchni drożdży gatunków *Candida albicans* oraz *Candida parapsilosis* towarzyszyło uwalnienie peptydów wykazujących funkcje podobne do tych obserwowanych dla kinin. Głównymi enzymami odpowiedzialnymi za degradację kininogenu okazały się proteazy aspartylowe wydzielane przez drożdże (SAP). *Candida albicans* wydziela głównie proteazę SAP2. Enzym ten najlepiej degradował LK w kwaśnym środowisku, powodując uwalnianie głównie peptydów takich jak Met-Lys-bradykinina oraz jej pochodna Met-Lys-hydroksyprolilo-3-bradykinina. Powstawała również niewielka ilość peptydów bez reszty argininy na C-końcu (des-Arg⁹-Met-Lys-bradykinina). Peptydy te były w stanie oddziaływać z receptorami kininowymi, przy czym ostatni wymieniony peptyd, des-Arg metabolit wykazał zdolność do stymulacji produkcji cytokin (IL-1 β i IL-6) w komórkach monocytarnych [24]. Proteazy SAPP1 i SAPP2, uzyskane z gatunku *Candida parapsilosis*, wykazały podobną zdolność do degradacji kininogenów w kwaśnym pH, po której powstawały dwa peptydy kininowe: Met-Lys-bradykinina i Leu-Met-Lys-bradykinina. Uzyskane peptydy wykazały wysokie powinowactwa do receptora B2 i stymulowały komórki śródbłonna do wydzielania cytokin. Ponadto, inkubacja tych peptydów z ludzkim osoczem przyczyniła się do generowania ich des-Arg metabolitów [25]. Podsumowując, wyniki uzyskane w tych badaniach wykazały, że patogeny z rodzaju *Candida* mogą uwalniać kininy z kininogenu w miejscach infekcji, co prowadzi do pogłębiania zakażenia.

b) Podsumowanie osiągnięć, realizowanych w miejscu moich poprzednich zatrudnień

Moje pierwsze zatrudnienie miało miejsce w Szpitalu Uniwersyteckim w Krakowie w Zakładzie Diagnostyki, gdzie pracowałam w rutynowej analizie biochemicznej, ale wykonywałam również bardziej specjalistyczne oznaczenia biochemicznych markerów chorób, takie jak aktywność rybonukleazy, poziom białek niskocząsteczkowych (β -2 mikroglobulina, wolne łańcuchy immunoglobuliny), mikroalbuminuria w moczu czy selektywne oznaczanie immunoglobulin w surowicy. Ponadto brałam udział w badaniach związanych z opracowaniem nowych metod diagnostyki klinicznej. Byłam również zaangażowana w badania kliniczne dotyczące diagnostyki chorób nerek, zwłaszcza w zaburzeniach po dializie. Ponadto, razem z grupą profesora Jerzego

W. Naskalskiego, prowadziłam badania związane z procesami zachodzącymi podczas fagocytozy. W ramach tych badań wykazano rolę układu mieloperoksydaza/H₂O₂/Cl w oksydacyjnym uszkodzeniu immunoglobulin, które może prowadzić do patologicznej akumulacji fragmentów immunoglobulin w miejscu zapalenia [41].

Po moim przeniesieniu do Zakładu Biochemii Klinicznej Collegium Medicum UJ, moje zainteresowania nadal pozostawały w obrębie tematyki związanej z diagnostyką kliniczną, tym razem w zakresie czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Uczestniczyłam w kilku projektach realizowanych pod kierunkiem profesor Aldony Dembińskiej-Kieć, związanych z patologicznym metabolizmem lipidów i apolipoprotein w różnych zaburzeniach, takich jak hiperinsulinemia, miażdżyca, otyłość, udar mózgu, otępienie naczyniowe, czy inne patologie układu krążenia. Główne osiągnięcia badań prowadzone w tym okresie zostały opisane poniżej.

Badania prowadzone w modelu komórkowym (linia hepatocytów HepG2) wykazały, że skład białek znajdujących się we frakcji osocza lipoprotein o dużej gęstości (HDL) został zmieniony pod wpływem insuliny [42]. Efekt ten był zależny od stężenia insuliny. Wyniki uzyskane w modelu komórkowym korelowały z klinicznymi obserwacjami prowadzonymi u normolipemicznych pacjentów z hiperinsulinemią, u których zbadano profil apolipoprotein we frakcji HDL. Te obserwacje sugerowały, że wzrost stężenia insuliny u pacjentów normolipemicznych może prowadzić do destabilizacji frakcji HDL, powodując przy tym zwiększenie ryzyka miażdżycy i inne zaburzenia z nią związane (nadciśnienie tętnicze, nietolerancja glukozy, otyłość). Dodatkowe badania prowadzone u pacjentów z prawidłowym profilem lipidowym, bez zaburzeń metabolizmu węglowodanów ale z potwierdzoną angiograficznie chorobą wieńcową wykazały zaburzenia w składzie frakcji HDL [43]. Badania te potwierdziły znaczącą rolę składu HDL w utrzymywaniu prawidłowego odwrotnego transportu cholesterolu, którego zaburzenie mogłoby doprowadzić do akumulacji lipidów. Część badań wykonanych w tym okresie była prowadzona w ramach międzynarodowych projektów dotyczących analizy epidemiologicznej w reprezentatywnej populacji mieszkańców w południowo-wschodniej Polsce („*Multinational Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Diseases Pol-MONICA Kraków*” oraz “*Poland-US Collaborative Study on Cardiovascular and Cardiopulmonary Epidemiology*”).

Jedną z apolipoprotein, apolipoproteina E (apo E), wchodzi w skład HDL i występuje w różnych izoformach, które wynikają z punktowej mutacji kodującego ją genu. Najbardziej rozpowszechnione są 3 allele: apo ε2, ε3 i ε4, kodujące trzy

homozygotyczne fenotypy (apo E4/4, apo E3/3 i apo E2/2) oraz trzy heterozygotyczne fenotypy (apo E4/3, apo E4/2 i apo E3/2). W naszych badaniach udało się wykazać, że pacjenci, u których występuje izoforma apo E3 najczęściej posiadają normalny metabolizm lipidów, natomiast pacjenci z izoformą apo E4 i E2 wykazują zaburzenia w usuwaniu lipidów, które często prowadzą do choroby niedokrwienia serca (IHD) lub miażdżycy [44, 45]. Ponadto, stwierdzono silny związek między częstotliwością występowania patologicznych izoform a ryzykiem występowania hiperinsulinemii u pacjentów ze stwierdzoną IHD [46]. Porównywalne wyniki uzyskano w badaniach pacjentów z nadciśnieniem tętniczym [47]. Izoformy apo E2 i apo E4 występowały częściej u pacjentów z nadciśnieniem niż u osób z prawidłowym ciśnieniem tętniczym, przy czym izoforma apo E4 była częściej obecna u pacjentów z hiperinsulinemią.

Kolejne badania związane z zaburzeniami genetycznymi dotyczyły wpływu mutacji genu apolipoproteiny CIII na częstość występowania otyłości. Wykazano w nich, że obecność polimorfizmu Sst I w regionie 3' nie ulegającym translacji genu apolipoproteiny CIII silnie korelowała z hipertriglicydemią osób rodziny obciążonej genetycznie otyłością.

Część badań epidemiologicznych wykonanych u osób starszych z południowo-wschodniej Polski, wykazała dużą częstotliwość izoform apo E2 i E4, która korelowała z zaburzeniami poznawczymi i ze zwiększonym ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych [48]. Badania te zostały wykonane w ramach międzynarodowego projektu "*Cognitive impairment and cardiovascular disease risk factors. CASCADE-Krakow*".

Podsumowując moją działalność w tej tematyce można stwierdzić, iż ustalono nowe fakty związane z korelacją pomiędzy składem osoczowej frakcji lipidowej HDL a występowaniem zaburzeń związanych z metabolizmem lipidów i węglowodanów. Ponadto wykazano, iż występowanie genetycznych zaburzeń genów białek zaangażowanych w metabolizm lipidów może zwiększyć prawdopodobieństwo występowania chorób układu sercowo-naczyniowego, takich jak miażdżycy, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, czy otyłość. Można zatem wnioskować, że wczesne wykrycie czynników ryzyka może przyczynić się do przeciwdziałania wystąpieniu wyżej wymienionych chorób.

Inny kierunek moich zainteresowań był związany z badaniami prowadzonymi w Zakładzie Biochemii Klinicznej pod kierunkiem profesor Aldony Dembińskiej-Kieć przez profesora Józefa Dulaka oraz profesor Alicję Józkowicz i dotyczył dysfunkcji

śródbłonna. Poniżej przedstawiam osiągnięcia uzyskane w wyniku mojego udziału podczas realizacji licznych badań związanych z tą tematyką.

Funkcja śródbłonna w naczyniach krwionośnych jest regulowana przez różne czynniki, między innymi przez wolny rodnik – tlenek azotu (NO). Kliniczne badania prowadzone przez nas we współpracy z różnymi Klinikami Szpitala Uniwersyteckiego koncentrowały się na pomiarze NO w różnych płynach ustrojowych pacjentów, u których występowały choroby powiązane z dysfunkcją śródbłonna. Pomiar NO, ze względu na jego naturę wolnego rodnika, jest dość trudnym zadaniem, zwłaszcza w płynach fizjologicznych. Nasze badania udało się przeprowadzić dzięki opracowaniu czulej metody, pozwalającej na oznaczanie stabilnych metabolitów NO, czyli jonów azotynów/azotanów w płynach ustrojowych [49]. Analizy prowadzone u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym wykazały, że infuzja L-argininy, będącej substratem dla produkcji NO, spowodowała wzrost wydalania jonów azotynów/azotanów do moczu z równoczesnym działaniem hipotensyjnym [50]. Wyniki tych badań sugerują, że korzystny wpływ L-argininy związany jest z produkcją wolnego rodnika NO, który może przyczynić się do poprawy funkcji śródbłonna u osób z pierwotnym nadciśnieniem. W innym badaniu wykazaliśmy również ochronny efekt infuzji L-argininy u osób z chorobą wieńcową [51]. Kolejne badania były związane z zaburzeniem funkcji śródbłonna u kobiet w okresie okołomenopauzalnym i po menopauzie [52-56]. Badano również, jaki wpływ ma hormonalna terapia zastępcza (HTZ) na funkcję śródbłonna u tych kobiet. Główne osiągnięcie tych badań było związane z korzystnym efektem 17- β estradiolu, wywoływanym u kobiet z nadciśnieniem w okresie menopauzy. Polegał on na wzroście poziomu NO, czynnika rozszerzającego naczynia krwionośne oraz zmniejszeniu poziomu endoteliny-1, która z kolei jest odpowiedzialna za zwężanie naczyń krwionośnych. Te wyniki pozwoliły wysunąć hipotezę o ochronnym wpływie HTZ w poprawie dopływu krwi do tkanek i obniżeniu ciśnienia tętniczego. Korzystny efekt HTZ potwierdzono również ze względu na obniżony poziom czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), czynnika angiogennego specyficznego dla komórek śródbłonna, który jest produkowany w odpowiedzi na niedotlenienie komórek. Podsumowując, w badaniach klinicznych potwierdziliśmy, że funkcja śródbłonna jest zależna od rodnika NO. Zastosowanie terapii takich jak HRT czy infuzji L-argininy może, poprzez regulację pracy endotelium, modulować redystrybucję krwi podczas wysiłku i chronić tkanki przed niedokrwieniem. Kliniczne obserwacje zmotywowały naszą grupę do dalszych badań

procesów odpowiedzialnych za niedokrwienie w komórkowym modelu śródbłonka. Niektóre z tych badań były związane z angiogenezą i wykazały one wpływ NO na powstawanie nowych naczyń krwionośnych poprzez indukcję VEGF. Inne badania, bliższe moim zainteresowaniom, były związane z mediacją NO w procesach zapalnych.

NO może być generowany z L-argininy przez działanie syntazy tlenu azotu. Istnieją 3 różne syntazy NO: śródbłonkowa syntaza tlenu azotu (eNOS), neuronalna syntaza tlenu azotu neuronów (nNOS) oraz indukowalna syntaza tlenu azotu (iNOS). Badania przez nas wykonane udowodniły, że NO powoduje wzrost produkcji VEGF w komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych (VSMC) [57]. Efekt ten był stymulowany przez NO wydzielany przez komórki za pośrednictwem zarówno eNOS, jak i iNOS. Wyniki te zasugerowały możliwość wykorzystania donorów NO czy terapii genowej w zaburzeniach związanych z niedokrwieniem, gdzie angiogenne procesy mogą być pożądane [58]. Rzeczywiście, w eksperymentalnym modelu uszkodzenia śródbłonka (za pomocą angioplastyki balonowej) lub zawału mięśnia sercowego zaobserwowano zwiększoną ekspresję mRNA iNOS i VEGF, co sugerowało, iż NO i VEGF mogą pośredniczyć w reendotelizacji oraz kontrolować powstawanie neointymy [59]. Z drugiej strony transfekcja komórek VSMC genami eNOS i iNOS nasilała syntezę VEGF [60]. Te obserwacje stały się mocnym argumentem przemawiającym za rozwinięciem badań w kierunku zastosowania terapii genowej w celu poprawienia funkcji śródbłonka.

Pośrednictwo NO w procesach zapalnych badano również w modelach komórkowych. W badaniach prowadzonych na makrofagach wyizolowanych z otrzewnej szczura zaobserwowano nagromadzenie utlenionej frakcji lipidów o niskiej gęstości (ox-LDL) po stymulacji komórek donorami NO i prostaglandyną E₂ [61]. Uzyskane wyniki sugerowały, że odwrotny transport cholesterolu może być zaburzony przez te cząsteczki, prawdopodobnie na drodze prozapalnych procesów zależnych od cyklicznych nukleotydów. Wyniki okazały się być zgodne z uzyskanymi w innym badaniu, w którym na komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych szczura wykazano hamujący wpływ ox-LDL na uwalnianie NO, cyklohydrolazy GTP i VEGF przez komórki [62]. Podobne wyniki uzyskano w szczurzych makrofagach, w których również utleniona frakcja LDL hamowała ekspresję mRNA iNOS, cyklohydrolazy GTP i czynnika TGF- β [63]. Obserwacje wylaniające się z tych badań pozwoliły wnioskować o pośrednictwie NO w regulacji procesów zapalnych, podczas których zwiększona ilość wolnych rodników może rozwijać procesy miażdżycowe na ścianie

naczyń krwionośnych. Ponadto, udowodniono, że 17- β estradiol powoduje produkcję NO i VEGF w mysich makrofagach [64]. W związku z tym NO reguluje procesy zachodzące przy ściance naczyń krwionośnych nie tylko poprzez jego wydzielanie przez komórki śródbłonna i VSMCs, ale również przez makrofagi.

Podsumowując, w trakcie pracy wykonanej w okresie przed moim aktualnym zatrudnieniem, miałam okazję zapoznania się z ciekawą tematyką wiążącą klasyczną biochemię z biochemią kliniczną. Brałam udział w badaniach, które dążyły do zanalizowania procesów biochemicznych zachodzących w różnych chorobach związanych z zaburzeniami sercowo-naczyniowymi. Po przejściu do aktualnej pracy starałam się połączyć osiągnięcia wcześniej uzyskane z tematyką podjętą w nowym miejscu pracy, począwszy od badań opisanych w poprzedniej sekcji po te, będące podstawą postępowania habilitacyjnego.

c) Inne osiągnięcia naukowe

Podczas mojej kariery naukowej poszerzałam moje zainteresowania w różnych projektach, we współpracy z innymi ośrodkami badawczymi.

Wspólnie z Wydziałem Energetyki i Paliw Akademii Górniczo-Hutniczej rozpoczęłam badania nad adsorpcją białek na powierzchni nanocząstek syntetyzowanych materiałów ceramicznych [65]. Wyniki tych badań okazały się ciekawe, a badania te są nadal w toku.

Kolejna współpraca, z grupą profesora Alexandra Faussnera z Institute of Cardiovascular Prevention Uniwersytetu Ludwiga Maximiliana w Monachium, obejmowała badanie nad syntetycznymi agonistami receptorów kininowych, zwłaszcza dla B1R. Ta kooperacja zainicjowała szereg eksperymentów przeprowadzonych w naszym Zakładzie, których wyniki zostały opublikowane, ale planuje się dalszą współpracę w ramach nowego projektu.

Oprócz tego, w innych projektach realizowanych w kooperacji z Zakładem Biotechnologii Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego, zaangażowałam się w badanie mediatorów stresu oksydacyjnego [66]. W ramach tej współpracy rozwinęłam metodykę do oznaczenia markerów stresu oksydacyjnego, m.in. glutationu i reaktywnych form tlenu (ROS).

6. Dalsze perspektywy badawcze

W ciągu ostatniego roku przeprowadziłam nowe badania związane z głównym tematem moich obecnych zainteresowań. Dotyczą one regulacji procesów zapalnych wywoływanych przez kininy w komórkach nerwowych. Badania te były częściowo realizowane pod moim nadzorem przez studentów studiów magisterskich i licencjackich. W badaniach przeprowadzonych w komórkowym modelu choroby Parkinsona udało nam się udowodnić znaczącą prozapalną rolę peptydów kininowych, które przyczyniały się do pogłębienia procesów degeneracji komórek. Wyniki uzyskane z tych badań są w trakcie przygotowania do publikacji. Badania te dostarczyły również interesujących danych sugerujących współdziałanie pomiędzy receptorami kininowymi a receptorami dopaminergicznymi, jednymi z głównych receptorów zaangażowanych w chorobie Parkinsona. Wyniki są na tyle obiecujące, że kierunek moich najbliższych zainteresowań wiąże z kontynuacją tych badań. Planuję realizować badania dążące do wykazania interakcji pomiędzy tymi dwoma typami receptorów na poziomie molekularnym. Wraz z grupą studentów zamierzam zbadać to zagadnienie oraz sprawdzić, jaki wpływ na podstawowe funkcje receptorów może mieć interakcja pomiędzy nimi. Planujemy wykonać te badania w ramach współpracy międzynarodowej w oparciu o projekt naukowy, który jest w przygotowaniu.

Pragnę także zaznaczyć, że zamierzam kontynuować rozpoczęte badania w ramach współpracy z innymi jednostkami badawczymi. Dotyczy to m.in. współpracy z grupą doktor Marceli Moreno z Universidad de Antioquia w Kolumbii, która dotyczy badania właściwości przeciwgrzybiczych ekstraktów pochodzących z leczniczych roślin tropikalnych. Badania te są dość zaawansowane i bardzo obiecujące. Ponadto w ramach projektu studenckiego, przeprowadzanego pod moim kierunkiem, udało się wykazać również antyproliferacyjny efekt ekstraktów tych roślin w komórkach nowotworowych. Te obiecujące wyniki motywują nas do kontynuowania badań.

7. Podsumowanie końcowe

W ramach badań prowadzonych w trakcie mojej pracy naukowej uzyskałam interesujące osiągnięcia, które zostały opublikowane w 47 artykułach (wykaz znajduje się w załączniku nr 4 a kopia w załącznikach 5 i 7), z których 31 znajduje się w bazie Journal Citation Reports.

Suma współczynnika IF wszystkich czasopism, w których opublikowane zostały moje prace przygotowane po obronie pracy doktorskiej, jest równa 55,291. Według Web of Science

(14.08.2014 r.) publikacje te były cytowane 680 razy (659 bez autocytowań). Indeks Hirsha według bazy Web of Science jest równy 9 (z dn. 14.08.2014)

Ponadto, badania opisane powyżej zostały wykonane w ramach 13 projektów, z których w pięciu byłam kierownikiem, w kolejnych pięciu byłam głównym wykonawcą a w pozostałych członkiem zespołu badawczego. Sześć z tych projektów było sponsorowane przez KBN lub Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, a kierowane były przez Aldonę Dembinską-Kieć (1), Józefa Dulaka (2), Ibeth Guevarę-Lorę (1), Alicję Józkowicz (1) i Andrzeja Kozika (1). Wyniki badań zostały przedstawione przeze mnie na 23 specjalistycznych konferencjach jako postery (24) oraz dwie ustne prezentacje; 12 z tych konferencji miało status międzynarodowych.

7. Piśmiennictwo

1. Blais C Jr., Marceau F, Roleau JL, Adam A (2000). The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons for the quantification of endogenous kinins. *Peptides* 21, 1903-1940.
2. Joseph K, Kaplan AP (2005) Formation of bradykinin: a major contribution to the innate inflammatory response. *Adv Immunol* 86, 159-208.
3. Colman RW, Schmaier AH (1997) Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 90, 3819-3843.
4. Kozik A, Moore RB, Potempa J, Imamura T, Rapala-Kozik M, Travis J (1998) A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites. Diverse effect of a mixture of neutrophil elastase and mast cell tryptase versus tissue and plasma kallikreins on native and oxidized kininogens. *J Biol Chem* 273, 33224-33229.
5. Duliński R, Suder P, Guevara-Lora I, Rapala-Kozik M, Potempa J, Silberring J, Imamura T, Travis J, Kozik A (2003) Attenuated kinin release from human neutrophil-elastase pretreated kininogens by tissue and plasma kallikreins. *Biol Chem* 384, 929-937.
6. Barbasz A, Guevara-Lora I, Rapala-Kozik M, Kozik A. (2008) Kininogens binding to the surfaces of macrophages. *Int Immunopharm* 8, 211-216.
7. Barbasz A, Kozik A (2009) The assembly and activation of the kininforming systems on the surface of human U-937 macrophage-like cells. *Biol Chem* 390, 269-275.
8. Walter K, Perkins M, Drey A (1995) Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int* 1, 1-16.
9. Fernando L, Natesan S, Joseph K, Kaplan AP (2003) High molecular weight kininogen and factor XII binding to endothelial cells and astrocytes. *Thromb Haemost* 90, 787-795.
10. Mount MP, Lira A, Grimes D, Smith PD, Faucher S, Slack R, Anisman H, Hayley S, Park DS (2007) Involvement of interferon- γ in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 27, 3328-37.
11. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanism to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57, 27-77.
12. Maeda H, Wu J, Okamoto T, Maruo K, Akaike T (1999) Kallikrein-kinin in infection and cancer. *Immunopharmacology* 43, 115-128.
13. Finger EC, Giaccia JA (2010) Hypoxia, inflammation, and the tumor microenvironment in metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev* 29, 285-293.
14. Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM (2000) Kinins in pain and inflammation. *Pain* 87, 1-5.
15. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41-53.

16. Fraser PA (2011) The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability. *Free Radic Biol Med* 51, 967-977.
17. Su J, Cui M, Tang Y, Zhou H, Liu L, Dong Q (2009) Blockade of bradykinin B2 receptor more effectively reduces postischemic blood-brain barrier disruption and cytokines release than B1 receptor inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 388, 205-211.
18. Prat A, Biernacki K, Pouly S, Nalbantoglu J, Couture R, Antel JP (2000) Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 896-906.
19. Phagoo SB, Poole S, Leeb-Lundberg LMF (1999) Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1 β shift the repertoire of receptor subtypes B₂ to B₁ in human lung fibroblasts. *Mol Pharmacol* 56, 325-333.
20. Rodrigues ES, Silva RF, Martin RP, Oliveira SM, Nakaie CR, Sabatini RA, Merino FC, Pesqueroa JB, Bader M, Shimuta SI (2013) Evidence that kinin B2 receptor expression is upregulated by endothelial overexpression of B1 receptors. *Peptides* 42, 1-7.
21. Whalley ET, Figueroa CD, Gera L, Bhoola KD (2012) Discovery and therapeutic potential of kinin receptor antagonists. *Expert Opin Drug Discov* 7, 1129-1148.
22. da Costa PL, Sirois P, Tannock IF, Chammas R (2014) The role of kinin receptors in cancer and therapeutic opportunities. *Cancer Lett* 345, 27-38.
23. Böckmann S, Paegelow I (2000) Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *J Leukoc Biol* 68, 587-592.
24. Bras G, Bochenska O, Rapala-Kozik M, Guevara-Lora I, Kozik A (2012) Extracellular aspartic protease SAP2 of *Candida albicans* yeast cleaves human kininogens and releases proinflammatory peptides, Met-Lys-bradykinin and des-Arg⁹-Met-Lys-bradykinin. *Biol Chem* 392, 829-839.
25. Bras G, Bochenska O, Rapala-Kozik M, Guevara-Lora I, Faussner A, Kamysz W, Kozik A (2013) Release of active kinin peptides, Met-Lys-bradykinin and Leu-Met-Lys-bradykinin from human kininogens by two major secreted aspartic proteases of *Candida parapsilosis*. *Peptides* 48, 114-123.
26. Meager A (1999) Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine Growth F R* 10, 27-39.
27. Ehrenfeld P, Millan C, Matus CE, Figueroa JE, Burgos RA, Nualart F, Bhoola KD, Figueroa CD (2006) Activation of kinin B1 receptors induces chemotaxis of human neutrophils. *J Leukoc Biol* 80, 117-124.
28. Bertram CM, Baltic S, Misso NL, Bhoola KD, Foster PS, Thompson PJ, Fogel-Petrovic M (2007) Expression of kinin B1 and B2 receptors in immature monocyte-derived dendritic cells and bradykinin-mediated increase in intracellular Ca²⁺ and cell migration. *J Leukoc Biol* 81, 1445-1454.
29. Mercurio F, Manning AM (1999) Multiple signals converging on NF- κ B. *Curr Op Cell Biol* 11, 226-232.
30. Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami J, Bascands J (1998) The B₁-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF- κ B and induced upregulation of the bradykinin B₁-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest* 101, 2080-2091.
31. Ju H, Venema VJ, Liang H, Harris MB, Zou R, Venema RC (2000) Bradykinin activates Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signaling proteins in plasmalemmal caveolae. *Biochem J* 351, 257-264.
32. Xie B, Zhao J, Kitagawa M, Durbin J, Madri J, Guan J-L, Fu X-Y (2001) Focal adhesion kinase activates Stat-1 in integrin-mediated cell migration and adhesion. *J Biol Chem* 276, 19512-19523.
33. Silver DL, Naora H, Liu J, Cheng W, Montell DJ (2004) Activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: Localization in focal adhesions and function in ovarian cancer cell motility. *Cancer Res* 64, 3550-3558.
34. Profita M, Sala A, Bonanno A, Siena L, Ferraro M, Di Giorgi R, Montalbano AM, Albano GD, Gagliardo R, Gjomarkaj M (2008) Cysteinyl leukotriene-1 receptor activation in a human bronchial epithelial cell line leads to STAT-1 mediated eosinophil adhesion. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 1024-1030.

35. Caldenhoven E, van Dijk T, Raaijmakers JAM, Lammers JWJ, Koenderman L, de Groot RP (1995) Activation of the STAT-3/acute phase response factor transcription factor by interleukin-5. *J Biol Chem* 270, 25778–25784
36. Ho HH, Ivashkiv LB (2006) Role of STAT-3 in type I interferon responses. Negative regulation of STAT-1-dependent inflammatory gene activation. *J Biol Chem* 281, 14111–14118.
37. Levy DE, Darnell JE Jr. (2002) STATs: Transcriptional control and biological impact. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3, 651–662.
38. Grivennikov SI, Karin M (2010) Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 11–19.
39. Sokoloski JA, Sartorelli AC, Rosen CA, Narayanan R (1993) Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B block CD11b expression and alter adhesion properties of differentiated HL-60 granulocytes. *Blood* 82, 625–632.
40. Rapala-Kozik M, Karkowska J, Jacher A, Golda A, Barbasz A, **Guevara-Lora I**, Kozik A (2008) Kininogen adsorption to the cell surface of *Candida* spp. *Int Immunopharmacol* 8, 237–241.
41. Drożdż R, **Guevara I**, Naskalski JW (1995) Immunoglobulin cleavage by hypochlorous acid treatment. *Clin Chim Acta* 236, 155–160.
42. Goldsztajn P, Guzdek A, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, **Guevara I**, Kwaśniak M, Hartwich J, Piwowarska W, Dembińska-Kieć A (1996) Hyperinsulinemia inhibits secretion of apoAI more efficiently than secretion of apoAII and apoE. *Z Gastroenterol* 34, 46–48.
43. Iwanejko J, Kwaśniak M, Wybrańska I, Hartwich J, **Guevara I**, Zdzienicka A, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Piwowarska W, Miszczuk-Jamska B, Dembińska-Kieć A (1996) Heterogeneity of high-density lipoprotein particles and insulin output during oral glucose tolerance test in men with coronary artery disease. *Acta Diabetol* 33, 58–61.
44. Kwaśniak M, Malczewska-Malec M, Dembińska-Kieć A, **Guevara I**, Hartwich J, Zdzienicka A, Piwowarska W (1995) Apolipoprotein E isoforms in men with coronary heart disease. *Diabet Pol* 2, 210–215.
45. Kwaśniak M, Malczewska-Malec M, **Guevara I**, Zdzienicka A, Piwowarska W, Dembińska-Kieć A (1996) Apo E isoforms and risk factors of atherosclerosis development. *Acta Angiol* 2, 49–56.
46. Kwaśniak M, **Guevara I**, Zdzienicka A, Dembińska-Kieć A (1996) Częstość występowania izoform apoproteiny E u mężczyzn z chorobą niedokrwienną serca. *Czynniki Ryzyka* 4, 35–42.
47. Dembińska-Kieć A, Kawecka-Jaszcz K, Kwaśniak M, **Guevara I**, Pankiewicz J, Malczewska-Malec M, Iwanejko J, Hartwich J, Zdzienicka A, Stochmal A, Leszczyńska-Gołąbek I (1998) Apo E isoforms, insulin output and plasma lipid levels in essential hypertension. *Eur J Clin Invest* 28, 95–99.
48. Pajak A, **Guevara I**, Kwaśniak M, Dembinska-Kiec A, Grabarczyk E, Slowik A, Szczudlik A (1998) Cognitive impairment and cardiovascular disease risk factors. Project CASCADE Krakow. VII: Prevalence of apoprotein E isoforms in women and men at age 65–78 years of age. *Przegląd Lekarski* 55, 720–723.
49. **Guevara I**, Iwanejko J, Dembińska-Kieć A, Pankiewicz J, Wanat A, Polus A, Gołąbek I, Bartuś S, Malczewska-Malec M, Szczudlik A (1998) Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin Chim Acta* 274, 177–188
50. Czarnecka D, Malczewska-Malec M, Dembińska-Kieć A, Kawecka-Jaszcz K, **Guevara I**, Zdzienicka A. (1998) Blood pressure profile and variability in hypertensives treated with L-arginine infusion. *Blood Press Monit* 3, 91–96.
51. Grodecki J, Malczewska-Malec M, Baciór B, Kochman J, Kubiny A, **Guevara I**, Dembińska-Kieć A, Kawecka-Jaszcz K (1997) Wpływ L-argininy na generację NO w czasie testu stymulacji prawego serca. *Kardiologia* 48, 109–113.
52. Dembińska-Kieć A, Krzysiek J, Zdzienicka A, **Guevara I**, Tomaszewska A, Milewicz T, Wybrańska I, Radowski S, Dubiel J (1998) Przezskórna terapia substytucją 17-beta-estradiolem, jak i doustna terapia inhibitorem reduktazy HMG-CoA zmienia korzystnie stosunek tlenu azotu do endoteliny u kobiet po menopauzie. *Czynniki Ryzyka* 4, 72–80.
53. **Guevara I**, Zdzienicka A, Bartuś S, Krzysiek J, Milewicz T, Legutko J, Dubiel J, Malczewska-Malec M, Dembińska-Kieć A (1999) The effect of transdermal 17 β -estradiol or oral statin therapy on endothelial function in postmenopausal women. *Proc. of XXI Congress of the European Society of Cardiology*, Ed. F. Navarro-Lopez, Monduzzi Editore, Bologna, Italy, 157–164.

54. Dembińska-Kieć A, Krzysiek J, Dubiel J, Radowicki S, **Guevara I**, Milewicz T, Zdzienicka A, Legutko J, Janczak A, Bartuś S, Hartwich J, Tomaszewska A (1999) Transdermal 17- β estradiol replacement or statin therapy in post-menopausal women. Effects on serum nitric oxide, endothelin and lipid levels. *Kardiologia Polska* 51, 1-7.
55. Krzysiek J, Milewicz T, Dybkowski R, Janczak-Saif A, Dembinska-Kiec A, Zdzienicka A, **Guevara I**, Sztefko K, Radowicki S, Dubiel JS., Klimek R. (2001) Platelet activation and endothelial factors in standard exercise test and after menopause. *Przegląd Lekarski* 58, 419-425.
56. Czarnecka D, Kawecka-Jaszcz K, Olszanecka A, Dembinska-Kiec A, Malczewska-Malec M, Zdzienicka A, **Guevara I** (2004) The effect of hormone replacement therapy on endothelial function in postmenopausal women with hypertension. *Med Sci Monit* 10, 55-61.
57. Dulak J, Jozkowicz A, Dembinska-Kiec A, **Guevara I**, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, Florek I, Wojtowicz A, Szuba A, Cooke JP. (2000) Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscl Thromb Vas* 20, 659-666.
58. Dulak J, Jozkowicz A, **Guevara I**, Dembinska-Kiec A (1999) Gene transfer of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase- implications for gene therapy in cardiovascular diseases. *Pol J Pharmacol* 51, 233-241.
59. Dembinska-Kiec A, Piwowarska W, Sinzinger H, Bartus S, Konduracka E, Golabek I, Hartwich J, Zdzienicka A, **Guevara I**, Dudek D, Pietrzak I, Partyka L, Sadowski J, Dubiel J (1997) Influence of LDL-apheresis on vascular endothelial growth factor (VEGF165), von Willebrand factor (vWF) and beta-thromboglobulin (b-TG) levels in patients after PTCA or CABG. In *Advances in Lipoprotein and Atherosclerosis Reserch, Diagnostics and Treatment*, Ed. Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 131-136.
60. Jozkowicz Alicja, Cooke John P., **Guevara Ibeth**, Huk Ihor, Funovics Philips Pachinger Otmar, Weidinger Franz, Dulak Jozef (2001) Genetic augmentation of nitric oxide synthase increases the vascular generation of VEGF. *Cardiovasc Res* 51, 773-783.
61. Wybranska I, Baczynska E, Polus A, Zdzienicka A, **Guevara I**, Dembinska-Kiec A (1997) Modification of cholesterol transport from macrophages into HDL by insulin, PGE2 and NO-donors. In *Advances in Lipoprotein and Atherosclerosis Reserch, Diagnostics and Treatment*, Ed. Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 73-77.
62. Dulak J, Polus M, **Guevara I**, Polus A, Hartwich J, Dembińska-Kieć A (1997) Regulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclohydrolase GTP I (GTP-CH I) gene expression by ox-LDL in rat vascular smooth muscle cells. *J Physiol Pharmacol* 48, 689-697.
63. Dulak J, Polus M, **Guevara I**, Hartwich J, Wybranska I, Krzesz R, Dembinska-Kiec A (1999) Oxidized low density lipoprotein inhibits inducible nitric oxide synthase, GTP cyclohydrolase I and transforming growth factor beta gene expression in rat macrophages. *J Physiol Pharmacol* 50, 429-441.
64. Tomaszewska A, **Guevara I**, Wilczok T, Dembińska-Kieć A (2001) 17 β -estradiol- and lipopolysaccharide-induced changes in nitric oxide, tumor necrosis factor- α and vascular endothelial growth factor release from RAW 264.7 macrophages. *Gynecol Obstet Inves* 56, 152-159.
65. **Guevara-Lora I**, Czosnek C, Smycz A, Janik JF, Kozik A (2009) SiC nanoparticles as potential carries of biologically active substances. *J Phys Conf Ser* 146, 012022.
66. Taha H, Skrzypek K, **Guevara I**, Nigisch A, Mustafa S, Grochot-Przeczek A, Ferdek P, Was H, Kotlinowski J, Kozakowska M, Balcerczyk A, Muchova L, Vitek L, Weigel G, Dulak J, Jozkowicz A (2010) Role of heme oxygenase-1 in human endothelial cells. Lesson from the promoter allelic variants. *Arterioscl Thromb Vasc* 30, 1634-1641.



dr Ibeth Guevara-Lora