PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

Postępy Biologii Komórki

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 48, ISSUE 2/2021
(81–182)

www.pbkom.pl

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej
Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology

Redaguje Kolegium – Editors:

Barbara CHWIROT – *biologia komórki, biologia nowotworów botanika bchwirot@umk.pl*

Agata FILIP – *genetyka medyczna, onkologia a.filip@umlub.pl*

Grażyna HOSER – *cytometria, komórki macierzyste graho@cmpk.edu.pl*

Lilla HRYNIEWIECKA – *energetyka komórki, mitochondria lillah@amu.edu.pl*

Bożena KAMIŃSKA-KACZMAREK – *neurobiologia, biologia molekularna bozenakk@nencki.gov.pl*

Jerzy KAWIAK – *immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów jkawiak@cmkp.edu.pl*

Wincenty KILARSKI – *mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek wincenty.kilarski@uj.edu.pl*

Andrzej K. KONONOWICZ – *komórki roślinne, regulacja ekspresji genów u Pro- i Eukaryota, inżynieria genetyczna akononow@biol.uni.lodz.pl*
Krzysztof LEWANDOWSKI – *hematologia, onkologia, komórki macierzyste krzysztof.lewandowski@sk1.am.poznan.pl*

Marek MALESZEWSKI – *biologia komórki, embriologia zwierząt maleszewski@biol.uw.edu.pl*

Janusz MASZEWSKI – *komórki roślinne, regulacja cyklu komórkowego, organizacja jądra komórkowego i struktura chromatyny jmasz@biol.uni.lodz.pl*

Michał NOWICKI – *hemopoeza, nefrologia, organizacja i rozwój naczyń krwiononośnych mnowicki@ump.edu.pl*

Barbara PŁYTYCZ – *immunologia barbara.plytycz@uj.edu.pl*

Zdzisław SMORĄG – *klonowanie zwierząt, zwierzęta transgeniczne, regulacja płci, hodowla gamet i zarodków in vitro, sterowan rozród zwierząt zdzislaw.smorag@izoo.krakow.pl*

Maciej ZABEL – *histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek mazab@amp.edu.pl*

Jan ŻEROMSKI – *patologia, immunologia, cytometria jzeromski@amp.edu.pl*

Rada Redakcyjna – Advisory Board:
Andrzej ŁUKASZYK – przewodniczący, Szczepan BILIŃSKI, Mieczysław CHORĄŻY, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office:
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań, tel. 61 854 64 53, fax 61 854 64 40 *mnowicki@ump.edu.pl*
Redaktor techniczny – Zuzanna Podemska-Jedrzejczak *zpodemsk@ump.edu.pl*
@ Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – *Foundation for Cell Biology and Molecular Biology*
Indexed in: Biological Abstracts, Science Citation Index Expanded (SciSearch), Journal Citation Reports/Science Edition, BIOSIS Previews, Ulrich`s International Periodicals Directory, New Jersey, AGROS.

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Poznań, 2021-09-31

KOMÓRKI MACIERZYSTE I INŻYNIERIA TKANKOWA W TECHNOLOGII POZAUSTROJOWEJ PRODUKCJI MIĘSA

STEM CELLS AND TISSUE ENGINEERING FOR CULTURED MEAT PRODUCTION

Natalia HIPPMANN[1], Piotr RZYMSKI[1,2]

[1]Zakład Medycyny Środowiskowej,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
[2]Integrated Science Association (ISA),
Universal Scientific Education and Research Network (USERN)

Streszczenie: Współczesne sposoby pozyskiwania mięsa, na które rośnie globalne zapotrzebowanie, dalekie są od założeń zrównoważonego rozwoju, stwarzają zagrożenia epidemiologiczne, jak również środowiskowe, w tym także w kontekście stabilności klimatycznej, oraz budzą wątpliwości natury etycznej. W niniejszej pracy przybliżono najważniejsze technologiczne założenia pozaustrojowej produkcji mięsa jako realnej, zrównoważonej i bardziej bezpiecznej alternatywy. Omówiona została (i) charakterystyka komórek macierzystych stanowiących podstawę rozwoju całego procesu, (ii) prowadzenie współhodowli komórkowych, (iii) odtwarzanie fizjologicznych skurczy mięśni w warunkach *in vitro*, (iv) zastosowanie rusztowań 3D, (v) wykorzystywanie pożywek nie mających zwierzęcego pochodzenia, (vi) wdrożenie odpowiednio zaprojektowanych bioreaktorów przemysłowych oraz (vii) implementacja technik bioprintingu 3D. Dostępne współcześnie techniki *in vitro* pozwalają na uzyskanie mięsa zarówno zwierząt hodowlanych, jak i dzikich, a także produkcję mięsa dla zwierząt domowych – psów i kotów. Współczesny postęp naukowo-technologiczny, pilna potrzeba zapewnienia bezpieczeństwa klimatycznego i żywnościowego, jak również rosnąca, zwłaszcza pośród osób młodych, świadomość ekologiczna, tworzą optymalne warunki dla rozwoju i komercjalizacji produktów pozaustrojowego mięsa.

Słowa kluczowe: hodowla komórkowa, produkcja żywności, inżynieria tkankowa, mięso *in vitro*, bezpieczeństwo żywności

Summary: The global meat demand is increasing while its conventional production is not sustainable, creating epidemiological and environmental risks, including those related to climate stability. It also raises ethical concerns. The present paper characterizes cultured meat production as a realistic, more sustainable, and safer alternative. The following issues are discussed: (i) types of stem cells used to initiate the production process, (ii) co-culturing of different cell types, (iii) recreating muscle contrac-

tions under *in vitro* conditions, (iv) use of 3D scaffolding, (v) use of non-animal media for cell culture, (vi) implementation of industrial bioreactors, and (vii) use of 3D bioprinting technology. The discussed methods allow for the production of meat of livestock and wild animal species, and pet food. It appears that scientific and technological advances, the urgent need to ensure climate and food security, as well as the growing environmental awareness, especially among young people, create optimal conditions for the development and commercialization of cultured meat products.

Keywords: cell culture, food production, tissue engineering, cultured meat, food safety

WSTĘP

Zapewnienie bezpieczeństwa żywnościowego staje się jednym z najważniejszych wyzwań XXI w. z uwagi na prognozowany wzrost populacyjny, zmiany klimatyczne, zanieczyszczenie środowiska oraz postępujący rozwój gospodarczy i związany z nim konsumpcjonizm. Istotne obiekcje pod tym względem rodzi sektor hodowli przemysłowej zwierząt. Organizacja Narodów Zjednoczonych uznaje produkcję mięsa i produktów odzwierzęcych jako jedno z największych źródeł zużycia wody i powierzchni oraz emisji gazów cieplarnianych. Hodowla zwierząt zabiera 50% nadających się do zamieszkania terenów na Ziemi. Większość pól uprawnych zakładana jest w celu produkcji paszy. W rezultacie hodowla zwierząt odpowiada za 25% globalnego zużycia wody, ma 40% udział w stosowanych w rolnictwie pestycydów oraz wpływa na eutrofizację wód powierzchniowych na skutek spływu nutrientów z obszarów rolnych, odpowiadając w okresie lat 1950-2010 za trzykrotny wzrost nadwyżek wprowadzanego do środowiska azotu i pięciokrotny – fosforu [29, 67].

Jednocześnie, przemysłowa hodowla zwierząt rodzi szereg obiekcji o charakterze etycznym, związanych zarówno ze złym dobrostanem, jak i samym wykorzystywaniem zwierząt i ich zabijaniem. Pozyskiwanie mięsa od zwierząt dzikich nie jest natomiast realną alternatywą, a zarazem rodzi szereg obiekcji, również na tle epidemiologicznym [37, 73]. Polowanie na dzikie zwierzęta było w przeszłości źródłem transmisji istotnych klinicznie patogenów. Pierwszy przypadek zakażenia wirusem Ebola w Afryce Zachodniej był prawdopodobnie rezultatem kontaktu z nietoperzami owocożernymi [39], pochodzenie wirusa różyczki jest również odzwierzęce, związane z nietoperzami z rodzaju płaskonosów (*Hipposideros*) jako pierwotnymi gospodarzami [5], podczas gdy ludzki wirus niedoboru odporności 1 (HIV-1) i HIV-2 są powiązane z pierwotną transmisją i dalszą mutacją małpiego wirusa niedoboru odporności odpowiednio z szympansów oraz mangab szarych podczas przygotowywania i spożywania ich mięsa [16, 76]. Współcześnie handlem objętym jest na świecie ponad 18 tys. gatunków zwierząt (w tym ok. 7,6 tys. lądowych kręgowców, z czego 4,5 tys. gatunków ptaków, 1,2 tys. gadów i ssaków i ok. 500 gatunków płazów [37]. Szacuje się, że ok. 75%

nowych patogenów człowieka, w przeważającej większości reprezentowanych przez wirusy, ma pochodzenie odzwierzęce [37, 94].

Współczesna hodowla przemysłowa zwierząt również tworzy zagrożenia o charakterze epidemiologiczny. Przykładowo, znanych jest dotychczas sześć koronawirusów związanych ze świniami (w tym jeden z rodzaju *Deltacoronavirus*, jeden przedstawiciel *Betacoronavirus* i cztery gatunki z rodzaju *Alfacoronavirus*), w tym alfakoronawirus SADS-CoV, który jest potencjalnie zakaźny dla człowieka [26, 87]. Wirus Nipah, powodujący ciężkie zapalenie mózgu, układowe zapalenie naczyń i ciężkie zapalenie płuc, odpowiedzialny za regularne, coroczne wybuchy epidemii w południowej Azji, przenoszony przez nietoperze, również związany jest z hodowlą świń [38]. Hodowle trzody chlewnej sprzyjają również genetycznej reasortacji wirusów grypy, która polega na wymianie jednego bądź kilku fragmentów jednoniciowego RNA wirusa i ma miejsce, gdy jedną komórkę gospodarza zakazi więcej niż jeden szczep wirusa grypy. Jest to możliwe, gdyż drogi oddechowe świń charakteryzują się kwasem sialowym wykorzystywanym jako receptor zarówno przez hemaglutyniny ptasiego wirusa grypy (H5), jak i ludzkiego wirusa grypy (H1). W 2020 r. opisano szczep G4 EA H1N1, który wyewoluował na terenie chińskich hodowli trzody chlewnej i charakteryzuje się istotnym potencjałem pandemicznym. Jego genom stanowi materiał genetyczny wirusa ptasiej grypy, ale zawiera również fragmenty pochodzące m.in. z linii H1N1/09 [84]. Z kolei w lutym 2021 r. w Rosji wykryto pierwsze zakażenie człowieka wirusem ptasiej grypy H5N8, powiązane z fermami drobiu [90].

Ponadto, konwencjonalna produkcja mięsa wiąże się z ryzykiem narażenia na patogenne bakterie (np. *Salmonella*), pasożyty (tasiemce, glisty, nitkowce) oraz priony, będące czynnikami etiologicznymi chorób takich jak gąbczasta encefalopatia bydła [31]. Problem zakażeń bakteryjnych wymusza rosnące użycie farmaceutyków w hodowlach zwierząt, w tym antybiotyków, co z kolei przekłada się na wzrost ich emisji do środowiska i oddziaływania na jego elementy, jak również na promocję antybiotykooporności, zjawiska rozpoznanego przez Światową Organizację Zdrowia jako jedno z bardziej istotnych wyzwań zdrowia publicznego [18, 49]

Z powyższego omówienia wynika jednoznacznie, że współczesne sposoby pozyskiwania mięsa na cele konsumpcyjne nie spełniają zasad zrównoważonego rozwoju, sprzyjają degradacji środowiska, zmianom klimatu, a także rodzą istotne zagrożenia o charakterze zdrowotnym. Aspekt ograniczenia konsumpcji mięsa, na korzyść produktów roślinnych, znalazł odzwierciedlenie zarówno w raporcie Międzyrządowego Zespołu ds. Zmian Klimatu powołanego przez ONZ w 2019 r., oficjalnym stanowisku Rady Naukowej Europejskich Akademii Nauk (EASAC), a także w stanowisku opublikowanym na łamach czasopisma BioScience, które podpisało łącznie 11 tys. badaczy ze 152 krajów. Z drugiej strony, globalna konsumpcja mięsa rośnie, osiągając niemal 350 milionów ton rocznie [71]. Mimo wzrostu popularności diet roślinnych, nie wydaje się, by ich dalsza promocja mo-

gła stanowić realny sposób rozwiązania problemów, którym sprzyja produkcja mięsa. Przeciętne spożycie mięsa per capita wzrosło z 20 kg w 1961 r., do 43 kg w 2014 r. Najwyższy poziom konsumpcji mięsa odnotowuje się w krajach wysoko rozwiniętych – powyżej 100 kg na osobę w krajach takich jak Australia i USA oraz ok. 80 kg na osobę w Europie. Istotny wpływ na wzrost konsumpcji mięsa ma również populacja krajów rozwijających. W połowie lat .70 XX w. w Chinach spożywano rocznie mniej niż 10 mln ton mięsa, podczas gdy w 2012 r. już ponad 70 mln. Największy wzrost konsumpcji mięsa odnotowuje się natomiast w Indiach, których populacja liczyła niegdyś 40% osób stosujących dietę wegetariańską. Według prognoz Światowego Forum Ekonomicznego, do 2050 r. zapotrzebowanie na mięsa na całym świecie podwoi się – decydować będzie o tym zarówno wzrost liczebności ludzkiej populacji, jak i postępujący rozwój gospodarczy [95].

W związku z tym wszystkim potrzeba pilnych działań mających na celu odmianę współczesnego oblicza przemysłowej hodowli zwierząt [37, 67, 73]. W ostatnich latach, dzięki osiągnięciom technik hodowli komórkowej, inżynierii tkankowej oraz medycyny regeneracyjnej udało się istotnie rozwinąć produkcję tkanki mięśniowej w warunkach *in vitro* w celach spożywczych. Pierwszy tego typu produkt – burger wołowy złożony z 20 tys. włókien mięśniowych – powstał w 2013 r., jego produkcja zajęła trzy miesiące i kosztowała ponad 330,000 USD [83]. Na przestrzeni następnych lat znacząco zwiększyło się zainteresowanie pozaustrojową produkcją mięsa, co umożliwiło pokonanie wielu wyzwań, a także obniżyło koszty. W 2020 r. Singapurska Agencja Żywności dopuściła na rynek pierwszy produkt tego typu – mięso drobiowe w formie tzw. „nuggetsów", produkowane przez firmę Eat Just [40].

W niniejszej pracy omówiono najważniejsze technologiczne założenia pozaustrojowej hodowli mięsa na cele konsumpcyjne ze szczególnym uwzględnieniem charakterystyki komórek macierzystych stanowiących podstawę rozwoju całego procesu, prowadzenia współhodowli komórkowych, odtwarzania procesów fizjologicznych skurczy mięśni, zastosowania rusztowania 3D, wykorzystywania pożywek nie mających zwierzęcego pochodzenia, wdrożenia odpowiednio zaprojektowanych bioreaktorów przemysłowych oraz implementacji technik bioprintingu 3D.

OGÓLNA CHARKATERYSTUKA TKANKI MIĘŚNIOWEJ

Mięsem nazywamy wszystkie przeznaczone do spożycia części umięśnienia szkieletu zwierząt z przyległymi tkankami: tkanką łączną właściwą (włącznie z tłuszczową), tkanką chrzęstną, kostną nerwową, naczyniami krwionośnymi i pozostałością krwi. W przypadku procesu pozaustrojowej produkcji mięsa wyzwaniem staje się zatem nie tylko wytworzenie tkanki mięśniowej, ale także odtworzenie całego systemu tkanek współtworzących konwencjonalnie rozumia-

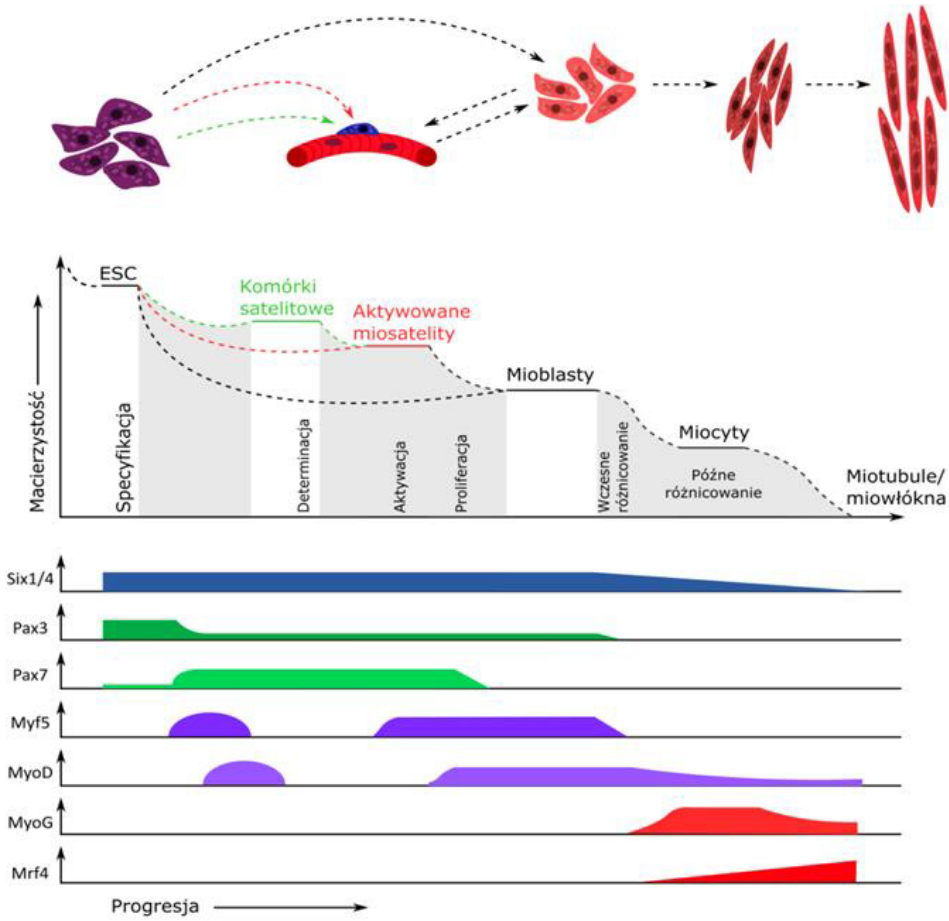
ne mięso. W przemyśle mięsnym, spożywane są najczęściej mięśnie prążkowane szkieletowe zwierząt hodowlanych. Mięsień szkieletowy jest wysoce wyspecjalizowaną tkanką, której główną funkcją jest generowanie skurczy. Podczas rozwoju zarodkowego ssaków, komórki mezodermy przekształcają się w mioblasty, a następnie długie, cylindryczne, wielojądrowe komórki (włókna) zlewają się w pęczki włókien mięśniowych, które stanowią wielojądrzasty zrąb. Funkcjonalny mięsień tworzą pęczki miotubuli z siecią naczyń włosowatych poprowadzonych przez środek, dostarczających niezbędnych substancji do prawidłowej pracy tkanki. Mioblasty, które nie przekształcą się w miotubule, pozostaną komórkami macierzystymi mięśni szkieletowych – komórkami satelitarnymi [74]. Komórki te są istotne w procesie regeneracji uszkodzonych tkanek, ale mają też kluczowe znaczenie dla hodowli *in vitro* [45]. Jednym z największych wyzwań w produkcji mięsa *in vitro* jest wybór najlepszego źródła komórek inicjatorowych do rozpoczęcia hodowli komórkowej [73].

KOMÓRKI INICJATOROWE I PROCESY ICH RÓŻNICOWANIA

KOMÓRKI MACIERZYSTE TKANKI MIĘŚNIOWEJ

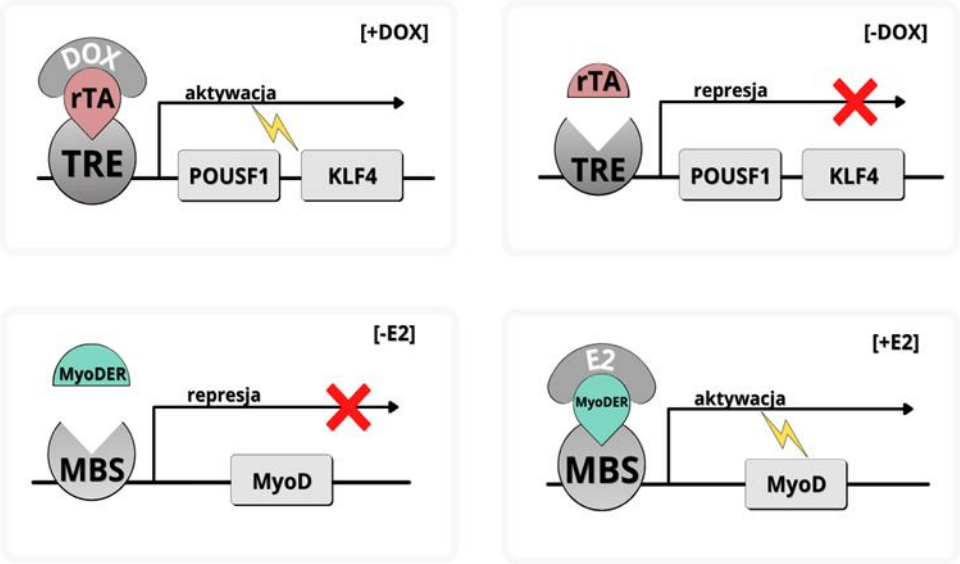
Komórki satelitarne mięśni, opisane pierwszy raz przez A. Mauro w 1961 r., umiejscowione są pod warstwą blaszki podstawnej miofibryli, gdzie przebywają w formie uśpionej i niezróżnicowanej [60]. W przypadku uszkodzenia tkanki, mogą one wejść w fazę mitotycznego podziału, co indukuje proliferację i fuzję mioblastów [13]. W produkcji mięsa *in vitro*, to właśnie one są najpowszechniejszym źródłem komórek mięśniowych. Wyzwaniem w ich hodowli jest trudność w utrzymaniu ciągłości proliferacji, ponieważ w warunkach *in vitro* poziom replikacji maleje wraz z wiekiem komórki [72] i może przekroczyć 20 podziałów, nie osiągając nawet limitu Hayflicka, czyli typowej dla komórek macierzystych liczby podziałów (50-70). Rozwiązaniem tego problemu może być m.in. rutynowe uzupełnianie hodowli immoratlizowanymi komórkami, co skutkuje zwiększeniem potencjału proliferacyjnego [64].

Trwają również prace z zastosowaniem specyficznych inhibitorów, mających na celu utrzymać komórki satelitowe w stanie macierzystości, bez determinacji w kierunku mioblastów. Komórki satelitowe niezdeterminowane charakteryzują się ekspresją PAX7, przy jednoczesnym braku ekspresji myoD (**Ryc. 1**). Z badań wynika, że aktywacja szlaku sygnałowego kinazy p38α/β MAPK prowadzi do systematycznego spadku ekspresji PAX7 [88]. W związku z tym, zastosowanie inhibitora p38α/β MAPK pozwala na wydłużenie cykli proliferacyjnych komórek satelitowych w warunkach *in vitro*. Ograniczeniem tej metody jest natomiast hamowanie zdolności miosatelit, poddanych wcześniej działaniu powyższego inhibitora, do progresji w kierunku miocytów i tworzenia miotubul [23].



RYCINA 1. Najistotniejsze czynniki transkrypcyjne odgrywające rolę w kolejnych etapach miogenezy (na podstawie [6])
FIGURE 1. Main transcription factors in the myogenesis (based on [6])

Firma Memphis Meat opatentowała również metodę prowadzenia linii komórek satelitowych świni O2K (patent US20160227830A1) z zastosowaniem systemu TET-ON. Komórki transdukowane POU5F1 (OCT3/4) i KLF4, utrzymuje się pod kontrolą doksycyliny i beta-estradiolu z zastosowaniem transaktywatorów (**Ryc. 2**). W obecności doksycykliny nie dochodzi do ekspresji myoD i możliwe jest proliferowanie niezdeterminowanych komórek satelitowych. Usunięcie antybiotyku z medium, przy jednoczesnym dodaniu beta-estradiolu prowadzi do ekspresji myoD i progresji komórek w kierunku mioblastów. Tego typu rozwiązanie pozwala na istotne ekspandowanie populacji komórek satelitowych, ich krioprezerwację i długoterminowe przechowywanie i wykorzystywanie zgodnie z po-



RYCINA 2. System TET-ON zastosowany przez Memphis Meat w linii świńskich komórek satelitowych O2K uzyskanych z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (patent US20160227830A1)
FIGURE 2. The Tetracycline-Controlled Transcriptional Activation (TET-ON) system in the O2K cell line, obtained from induced pluripotent stem cells and patented by the Memphis Meat ((patent US20160227830A1)

trzebami produkcji mięsa. Takie rozwiązanie jest korzystne z punktu widzenia aspektów bezpieczeństwa żywności. Jego ograniczeniem jest natomiast występowanie potencjalnych śladowych ilości doksycykliny w produkcie docelowym, otrzymanym przy wykorzystaniu komórek O2K. Ryzyko to można ograniczyć w przypadku odpowiedniego przemycia komórek w trakcie pasażowania [73].

Po osiągnięciu określonej liczby, komórki te już z łatwością różnicują w komórki mięśniowe i bardziej złożone miofibryle [68]. Komórki macierzyste tkanki mięśniowej od lat z powodzeniem izoluje się z tkanek mięśniowych gatunków zwierząt o znaczeniu gospodarczym: -bydła domowego [24], kury domowej [96], owcy (40), świni domowej [92], ryb [70] oraz indyka domowego [61].

EMBRIONALNE KOMÓRKI MACIERZYSTE

Embrionalne komórki macierzyste (ESCs), izolowane z blastocysty po zapłodnieniu, są kolejnym potencjalnym źródłem komórek mięśniowych w hodowli, dzięki swojej zdolności do różnicowania. Mogą stanowić alternatywę dla komórek satelitarnych, ze względu na lepsze przystosowanie do warunków *in vitro*:

zdolność do utrzymania stanu aktywnej proliferacji, zachowania niezmienionego genotypu i wysoką ekspresję białka telomerazy, które odpowiada za utrzymanie odpowiedniej długości telomerów [3, 99]. Ich duża zdolność do różnicowania może być szczególnie korzystna na etapie inicjacji hodowli [86].

Dotychczas nie wyizolowano jednak stabilnej linii ESCs ze zwierząt hodowlanych, więc ich potencjał do przekształcenia się w komórki tkanki mięśniowej pozostaje niezbadany.

INDUKOWANE PLURIPOTENTNE KOMÓRKI MACIERZYSTE

Indukowane pluripotentne komórki macierzyste (iPSC) również mogą stanowić komórki starterowe w hodowli mięsa *in vitro*. Technologia iPSCs polega na przekształceniu zróżnicowanej już komórki, na przykład komórki skóry, w pluripotentną komórkę macierzystą poprzez uruchomienie ekspresji embrionalnych genów za pomocą specyficznych czynników transkrypcyjnych (tzw. czynników Yamanaki): Oct4, Sox2, KLF4 i c- Myc [85]. Czynniki te wprowadza się na drodze transdukcji z wykorzystaniem wirusowych wektorów integrujących bądź transfekcji plazmidu. Dotychczas udało się już pozyskać iPSC m.in. z fibroblastów świni domowej [28], a także przekształcić je w komórki mięśniowe [63]. Oprócz tego, komórki mięśni szkieletowych zostały także uzyskane poprzez odróżnicowanie dojrzałych komórek tłuszczowych [47]. Pracując z iPSC można docelowo uzyskać zarówno komórki mięśniowe, ale również adipocyty oraz komórki śródbłonka, a następnie wykorzystać je do strukturyzowania produktu docelowego, np. wołowiny [82].

MEZENCHYMALNE KOMÓRKI MACIERZYSTE

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs) to multipotencjalne komórki, które mogą być wyizolowane z płynu owodniowego, krwi pępowinowej, galarety Whartona i dojrzałych narządów, takich jak szpik kostny, miazga zębowa, płuca i wątroba [53]. W ciągu ostatnich lat, MSCs zostały skutecznie wyizolowane, między innymi, z bydła, bawołów i kózn [41]. Zespół Mann i in. wyizolował MSCs z płynu owodniowego zarodka wołu domowego i rozszerzał hodowlę do 20 pasaży. Komórki wykazywały ekspresję genów pluripotencji – Oct4, Nanog, Sox2 i GAPDH, podobnie do komórek ludzkich [58]. Innym potencjalnym źródłem MSCs jest krew pępowinowa [97]. Mezenchymalne komórki macierzyste mogą różnicować się w miocyty, a następnie miotuby, dzięki ekspresji Pax3, Pax7, MyoD, Myf-5 i MyoG – przez co, podobnie jak ESCs, mogą stanowić komórki inicjatorowe w hodowli.

STYMULACJA SKURCZY MIEŚNI W HODOWLI

Jednym z ważnych aspektów w hodowli tkanki mięśniowej jest zapobieganie atrofii miocytów. Jako że tkanka *in vitro* jest pozbawiona unerwienia i mięśnie

nie są w czynnym użyciu, istnieje ryzyko zaniku włókien mięśniowych, dlatego niezbędne jest zapewnienie komórkom możliwości wykonywania skurczy [7]. W warunkach *in vivo* mięsień szkieletowy podlega regularnym skurczom dzięki unerwieniu. W warunkach *in vitro* – mimo, że komórki czasami same ulegają spontanicznym skurczom – konieczna jest alternatywna stymulacja [21]. Oprócz zapobiegania atrofii, skurcze pozytywnie wpływają na wzrost i tworzenie odpowiedniej struktury tkanki [33]. Komórki można pobudzać mechanicznie. Jedna z metod polega na regularnym, cyklicznym umieszczaniu i zdejmowaniu obciążenia z pokrytego komórkami mięśni gładkich porowatego rusztowania, co promuje różnicowanie i łączenie się ze sobą komórek [14]. Oprócz tego, rozwiązaniem są ruchome rusztowania – na przykład kulki z biomateriału, które mogą się regularnie powiększać i pomniejszać [25]. Podobne do naturalnych warunki skurczu pobudzającego rozrost komórek mięśniowych udało się stworzyć w 2000 r., kiedy zauważono właściwość fibroblastów do organizacji włókien kolagenu w macierzy pozakomórkowej, tym samym tworząc stałe napięcie pomiędzy rozwijającymi się komórkami mięśniowymi [35]. Innym rozwiązaniem jest elektryczna stymulacja komórek. W badaniu przeprowadzonym w 2000 r. zauważono, że stymulacja elektryczna mięśnia *in vitro* jest bardziej efektywna niż mechaniczna: jej zaletą jest łatwość w stosowaniu na dużą skalę i pozytywny wpływ na formację sarkomerów i różnicowanie się komórek [20]. Umożliwia też skurcz każdego włókna z osobna, ponieważ sygnał elektryczny wnika głęboko w każdą komórkę, w przeciwieństwie do mechanicznego, pasywnego pobudzania [20]. Pozytywny wpływ na wzrost i rozwój komórek miało nawet hodowanie ich na mikrowłóknach, które znajdowały się pod stałym napięciem elektrycznym [43].

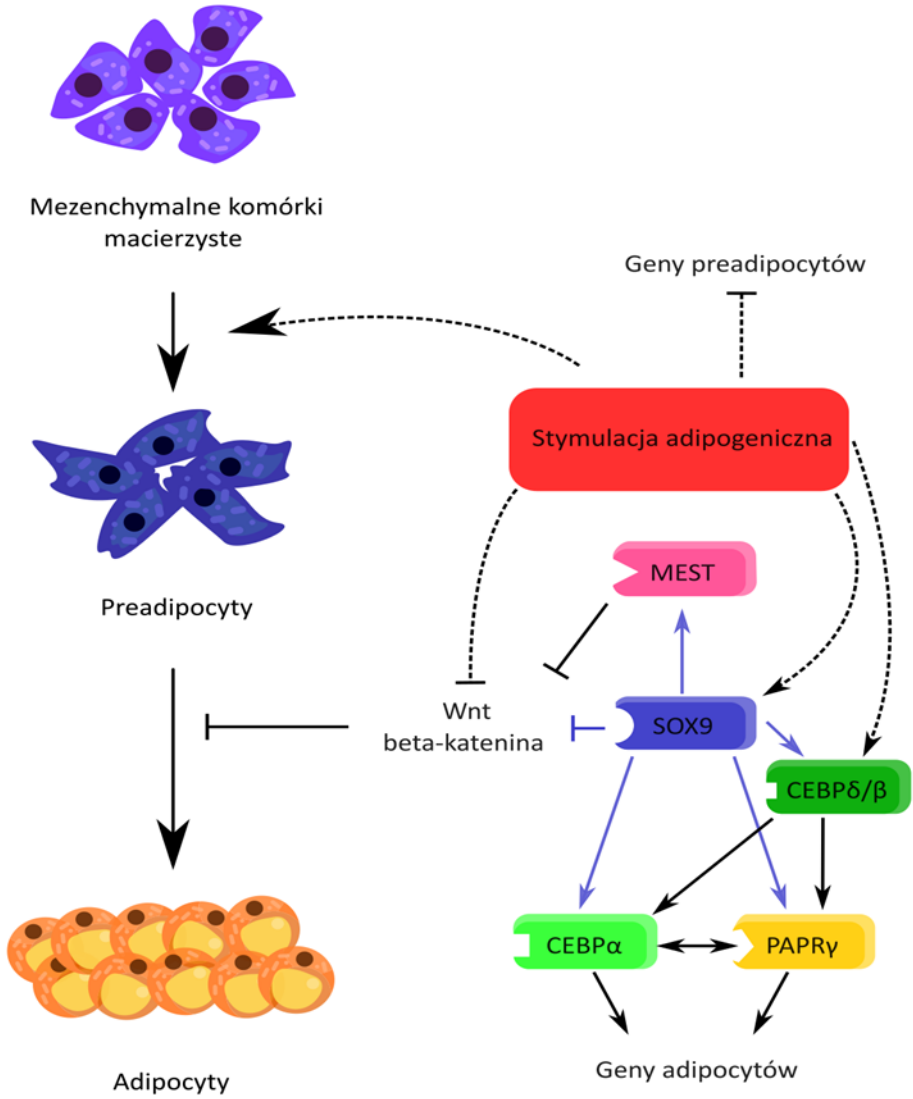
PROWADZENIE WSPÓŁHODOWLI Z FIBROBLASTAMI

Tkanka łączna w warunkach *in vivo*, w tym także w tkance mięśniowej, stanowi zrąb i ochronę mechaniczną dla innych tkanek i narządów oraz transportuje substancje odżywcze i produkty metabolizmu. Jest zbudowana z komórek oraz istoty międzykomórkowej – ECM (ang. *extracellular matrix*) – na którą składają się głównie włókna kolagenowe, glikozaminoglikany (np. kwas hialuronowy), proteoglikany i glikoproteiny. Fibroblasty stanowią najliczniejszą grupę komórek tkanki łącznej, ich główną funkcją jest produkcja składników ECM, między innymi kolagenu i elastyny [74]. Fibroblasty wpływają na wzrost i różnicowanie innych komórek i taki efekt został zaobserwowany także w przypadku ko-kultury z mioblastami. Ko-kultura jest hodowlą komórkową, do której powstania potrzebne są co najmniej dwa rodzaje komórek, co ma wpływać korzystnie na ich rozwój, poprzez lepsze odwzorowanie warunków naturalnych oraz parakrynną regulację odpowiednimi czynnikami wzrostu. Wykazano rolę fibroblastów

w proliferacji, różnicowaniu i fuzji komórek satelitarnych mięśni [56], z czym związany jest głównie czynnik wzrostu fibroblastów – FGF-2 (ang. *fibroblasts growth factor*) [91]. FGF-2 jest białkiem sekrecyjnym, aktywującym kinazę związaną z białkiem RhoA, która odpowiada za inhibicję procesu różnicowania się mioblastów poprzez fosforylację seryny substratów receptora insulinowego [55]. Inhibicja RhoA prowadzi do zwiększenia poziomu RhoE, które z kolei prowadzi do zróżnicowania w komórkę mięśniową i reguluje ścieżkę sygnałową związaną z M-kadheryną, biorąc tym samym udział w fuzji mioblastów [32]. Zatem czynniki wydzielane przez fibroblasty regulują stopień zróżnicowania komórek mięśniowych. Fibroblasty biorą też udział w zatrzymywaniu procesów apoptotycznych mioblastów podczas ich różnicowania poprzez regulację β1 integryny, ufosforylowanego białka Akt oraz białka antyapoptotycznego Bcl2 [101]. Dodatkowo, obecność fibroblastów może poprawiać walory smakowe mięsa, poprzez zwiększenie jego jędrności. Obecny stan wiedzy sugeruje, że odpowiednio zoptymalizowana hodowla fibroblastów i mioblastów jest kluczowa w odpowiednim wzroście tkanki mięśniowej, a produkcja mięsa *in vitro* będzie wymagała prowadzenia takiej ko-kultury [66].

WYKORZYSTANIE ADIPOCYTÓW

Adipocyty to komórki tkanki łącznej, których główną funkcją jest magazynowanie i produkcja energii z lipidów, izolacja termiczna oraz wypełnianie pustych przestrzeni w organizmie. Adipocyty rezydują także w tkance mięśniowej [74]. W przypadku mięsa, procent tkanki tłuszczowej wewnątrzmięśniowej jest podstawą do oceny jego marmurkowatości – parametru oceniającego smak i konsystencję mięsa. Większa zawartość tłuszczu pozytywnie wpływa na jego smak, jednakże konsumenci chętniej wybierają mięso, w którym tkanki tłuszczowej jest mniej, powołując się na niekorzystny wpływ tłuszczu zwierzęcego na zdrowie [11]. Marmurkowatość mięsa konwencjonalnego może być uwarunkowana przez genotyp, ale również dietę zwierzęcia [93]. Zaletą mięsa *in vitro* może być możliwość regulacji zawartości tkanki tłuszczowej, w zależności od potrzeb konsumenta. Istotnym wyzwaniem prowadzenia kultury adipocytów na cele konsumpcyjne jest wyeliminowanie związków chemicznych klasycznie wykorzystywanych do indukcji adipogenezy w mezenchylanych komórkach macierzystych. W tym celu wykorzystuje się bowiem insulinę, deksametazon, indometacynę oraz 3-izobutyl-1-metyloksantyna (IBMX). W hodowlach adipocytów na cele konsumpcyjne, zastosowanie tych związków jest wykluczone z uwagi na specyfikę ich aktywności biologicznej [36]. W związku z tym potrzebne są alternatywy działające jako induktory receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów gamma,



RYCINA 3. Główne szlaki uczestniczące adipogenezy, które wymagają odtworzenia w produkcji komórek tłuszczowych w procesie pozaustrojowej produkcji mięsa (na podstawie [36])
FIGURE 3. Main pathways of adipogenesis needed to be recreated in the production of cultured meat (based on [36])

których aktywacja jest jednym z głównych procesów w progresji adipogenezy (**Ryc. 3**). Postuluje się, iż induktorem tego typu może być m.in. kwas prystanowy, długołańcuchowy kwas nasycony, otrzymywany z kwasu fitanowego [34].

WASKULARYZACJA

W przypadku hodowli mięsa, które nie ulegnie przetworzeniu, na przykład wołowego steku, kluczowe staje się dokładne odwzorowanie struktury tkanki mięśniowej. Jednym z niezbędnych elementów jest jej odpowiednie unaczynienie. Jednym z proponowanych rozwiązań jest stworzenie sieci naczyń z jadalnego kolagenu lub z biomateriału, do którego mioblasty się przyłączą, a który następnie zostanie usunięty, pozostawiając wydrążone kanały symulujące naczynia krwionośne [25]. Idąc krok dalej, proponowane jest również zastosowanie podobnego modelu, jednakże z wykorzystaniem komórek tkanki nabłonkowej, która w warunkach *in vivo* buduje żyły i tętnice [10] – biopolimer zostałby pokryty nabłonkiem, a następnie usunięty, poprzez użycie odpowiedniego rozpuszczalnika. Alternatywną propozycją jest kontrolowana angiogeneza mięśnia w hodowli, w której mioblasty wzrastałyby w ko-kulturze z komórkami nabłonka z zastosowaniem cytokin promujących waskularyzację – VEGF, IGF-1, EGF [4].

WYBÓR ODPOWIEDNIEGO MEDIUM HODOWLANEGO

Powszechnie stosowanym źródłem składników odżywczych w hodowlach komórkowych *in vitro* są surowice zwierzęce, zwłaszcza surowice z cieląt (ang. *fetal bovine serum*, FBS) [42]. Głównym składnikiem FBS jest surowicza albumina bydlęca (ang. *bovine serum albumin*, BSA) – białko globularne, które po oczyszczeniu charakteryzuje się neutralnością i nie wykazuje aktywności enzymatycznej [57]. Z uwagi na to, że FBS powstaje jako produkt uboczny uboju krów, jest stosunkowo tani. Docelowo jednak, w produkcji mięsa *in vitro* dąży się do ograniczenia, a następnie całkowitego wyeliminowania FBS ze stosowania [65]. Wynika to z kilku czynników. Po pierwsze, koszt FBS (ok. 1000 zł za 0,5L) stosowanego w produkcji przemysłowej takiego mięsa znacząco podnosiłby cenę ostatecznego produktu. Po drugie, wykorzystanie surowic zwierzęcych pozyskiwanych z płodów budzi kontrowersje na płaszczyźnie etycznej. Po trzecie, wykluczenie FBS zwiększyłoby grupę potencjalnych odbiorców produktu o osoby obecnie stosujące diety roślinne. Po czwarte, stosowanie innych dodatków odżywczych do mediów umożliwiłoby zachowanie pełnej kontroli nad składem pożywki i pozwoliłoby spełnić wszystkie wymogi GMP (Good Manufacture Production).

The Good Food Institute przeprowadził w 2020 r. analizę [81] dotyczącą między innymi składu i kosztów syntetycznej pożywki. Essential 8 to powstałe w 2011 r., szeroko stosowane i dostępne komercyjnie medium komórkowe, nie zawierające składników pochodzenia zwierzęcego. Charakteryzuje się prostym składem: DMEM/F12, AA2P, $NaHCO_3$, selenin sodu, insulina, transferyna FGF-2

i TGF-β. Litr pożywki Essential 8 kosztuje 400 USD i według analizy ponad 99% kosztów generują czynniki wzrostu – insulina, transferyna, FGF-2 i TGF-β oraz jeden ze składników bazy medium: bufor HEPES. Raport przedstawia siedem realistycznych scenariuszy na obniżenie kosztów, między innymi poprzez zmniejszenie stężenia wszystkich czynników wzrostu oraz zastąpienie buforu HEPES, tańszym buforem TES – oszacowano, że w najlepszym przypadku cena jednego litra pożywki może spaść z 377 USD do 0.24 USD – udowadniając tym samym, że ostateczna cena mięsa produkowanego w laboratorium może w przyszłości osiągnąć wartość konkurencyjną do konwencjonalnego mięsa [81]. Warto również wspomnieć, że obecnie na rynku przybywa pożywek niemających zwierzęcego pochodzenie, np. ClonaCell™-HY AOF Expansion Medium, Gibco® CHO Medium lub MilliporeSigma™ Chemicon™ AOF ITS. Nie wszystkie tego typu media spełniają swoje zadanie w kulturach mioblastów, często stymulując proliferację w sposób istotnie niższy w porównaniu do FBS [50]. Do hodowli komórek w celu produkcji mięsa *in vitro* można by również wykorzystać lizat z ludzkich trombocytów, np. PLTGold®. W tym przypadku ograniczeniem jest jego bardzo wysoki koszt, kształtujący się obecnie na poziomie kilku tys. zł za 0.5L.

ZASTOSOWANIE SZTUCZNEGO RUSZTOWANIA

Wraz z intensywnym rozwojem inżynierii tkankowej, zrodziła się potrzeba nowego rodzaju podłoża, na którym komórki mają się dzielić, tak, aby jak najskuteczniej imitować naturalne warunki i tym samym tworzyć realistyczne modele tkanek *in vitro*. Jednym ze sposobów na utrzymanie określonej struktury przestrzennej hodowli, jest zastosowania sztucznego rusztowania. Do jego najważniejszych cech należą: umożliwienie swobodnego przemieszczania się i przylegania komórek, dostarczanie składników odżywczych, czynników wzrostu oraz biokompatybilność i biodegradowalność [15]. Najczęściej używanymi materiałami są m.in. naturalne polimery (kolagen, fibryna, kwas hialuronowy), surowce ceramiczne (tlenek glinu, hydroksyapatyt) i materiały syntetyczne (glikol polietylenowy, poliestry) [48]. Mioblasty w hodowli *in vitro* są komórkami spontanicznie się kurczącymi i wymagającymi kontaktu z podłożem do prawidłowego wzrostu, zatem najlepszym rodzajem rusztowania byłby elastyczny materiał o dużej powierzchni, który umożliwia swobodną dyfuzję medium z niezbędnymi składnikami, a także taki, który może być z łatwością oddzielony od finalnego produktu lub jest jadalny [19]. Wśród zaproponowanych rusztowań znalazły się kolagenowe, celulozowe lub chitozanowe mikrosfery, które powiększałyby się pod wpływem zmiany pH lub temperatury, dzięki czemu osadzone na nich włókna mięśniowe mogłyby być poddawane regularnym skurczom oraz kolagenowa siateczka, o tek-

sturze podobnej do gąbki o dużej powierzchni adhezyjnej dla komórek i wysokiej przepuszczalności dla substancji odżywczych [25]. Bardzo dobrą propozycją wydają się być mikrosfery kwas alginowego (Alginate), kopolimeru kwasu mannuronowego i kwasu guluronowego, które dostępne są komercyjnie, gdyż znajdują zastosowanie w sektorze medycznym [30]. Jednocześnie sole kwasu alginowego są bezpieczne dla konsumenta, mogą być wykorzystywane w produktach spożywczych i w przeciwieństwie do kolagenu, nie mają pochodzenia zwierzęcego [27].

KSZTAŁTOWANIE WŁAŚCIWOŚCI SENSORYCZNYCH

Akceptacja społeczna mięsa *in vitro* będzie zależała od jego właściwości sensorycznych, takich jak smak, tekstura, kolor i wartość odżywcza, dlatego kolejnym wyzwaniem w produkcji tej alternatywy będzie zadbanie o spełnienie tych oczekiwań. Wpływ na strukturę tkanki mają m.in. fizyczne warunki hodowli oraz ko-kultury. Tkanka mięśniowa wyhodowana w warunkach *in vitro* ma bardziej żółtawy niż czerwonawo-różowy kolor, charakterystyczny dla mięsa konwencjonalnego – głównie z powodu zmniejszonej ekspresji mioglobiny w warunkach dużej zawartości tlenu, jakie panują w hodowli [69]. Rozwiązaniem może być prowadzenie hodowli w warunkach niskotlenowych – zostało udowodnione, że prowadzi to do zwiększenia ekspresji mioglobiny, tym samym poprawiając koloryt tkanki [46]. Tekstura, smak i soczystość mięsa zależą od zawartości tłuszczu śródmięśniowego. Oprócz wspomnianej już ko-kultury z adipocytami, zawartość tłuszczu może być kontrolowana poprzez suplementację tłuszczy na końcowym etapie produkcji i zachowanie odpowiedniego stosunku kwasów tłuszczowych nasyconych do nienasyconych [9].

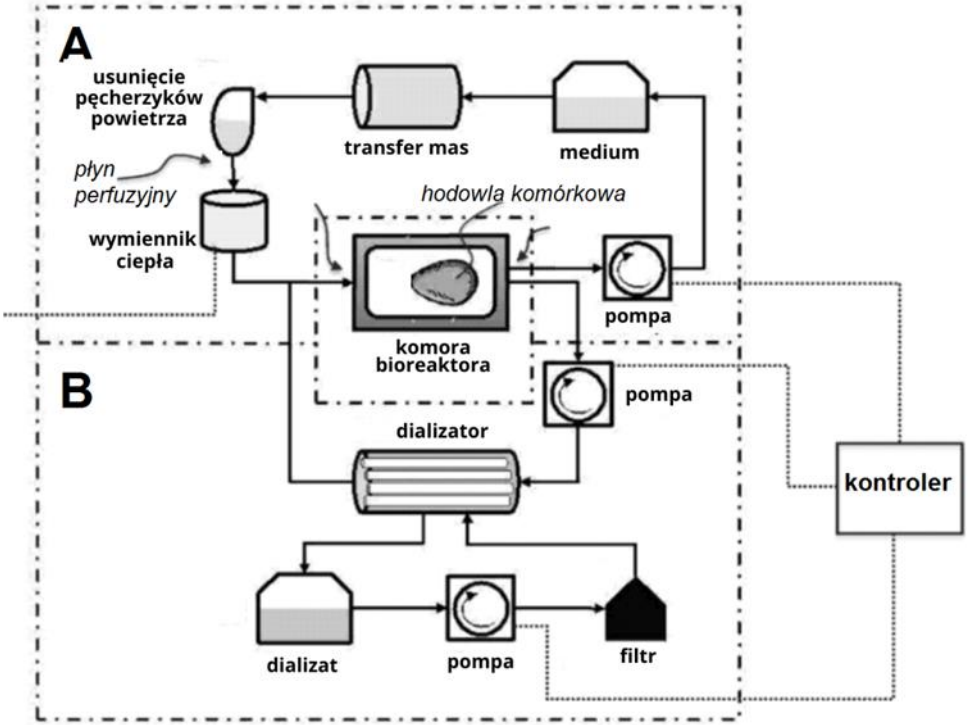
KSZTAŁTOWANIE WARTOŚCI ODŻYWCZEJ

Mięso pochodzenia naturalnego składa się z kilku tkanek – tkanki mięśniowej, tłuszczowej, łącznej i kostnej. Dzięki temu, mięso może być bogatym źródłem białek, aminokwasów, kwasów tłuszczowych, minerałów, takich jak cynk, selen, potas, sód, magnez, a także kreatyny i witamin A, B i D. Jest także istotnym źródłem witaminy B12, wytwarzanej przez bakterie występujące w jelitach zwierząt, oraz wysoce biodostępnego żelaza (Fe^{2+}) [98]. Zawartość białka zależy od gatunku i wieku zwierzęcia, średnio wynosi 22%. Podobnie zależności obserwuje się w odniesieniu do poszczególnych aminokwasów, np. wołowina posiada wysoki stosunek niezbędnych aminokwasów, takich jak leucyna, walina i lizyna, w porównaniu do cielęciny i wieprzowiny [1]. Istotnym składnikiem są także wy-

stępujące w mięsie nasycone kwasy tłuszczowe, które znacznie zwiększają wartość odżywczą, ale których nadmierne spożycie może sprzyjać rozwojowi chorób sercowo-naczyniowych [19]. Istotnym aspektem produkcji mięsa *in vitro* jest zapewnienie wszystkich wartości odżywczych mięsa konwencjonalnego z ewentualnym wyeliminowaniem niepożądanych składników. Rozwiązaniem może być suplementacja tkanki jonami Fe^{3+} związanymi z transferryną oraz witaminą B12. Dodatkowo, kompleks Fe^{3+} z transferryną po dotarciu do mitochondriów jest włączany do syntezy hemu, a tym samym syntezy mioglobiny i może korzystnie wpływać na osiągnięcie charakterystycznego, czerwonego koloru [19].

HODOWLA W BIOREAKTORZE

Jednym z największych wyzwań w produkcji mięsa *in vitro* jest zwiększenie skali produkcji, przy zachowaniu maksymalnej wydajności i opłacalności. Niezbędnym elementem jest więc bioreaktor, który zwiększa skalę procesu, zapewnia komórkom miejsce do wzrostu, a jednocześnie nie generuje dużych kosztów związanych z działaniem. W przemyśle farmaceutycznym tkanki zwierzęce są zazwyczaj hodowane w reaktorach o objętości od 1 do 20 m^3. Aby produkcja mięsa miała charakter masowy, z jednoczesnym zachowaniem konkurencyjnej ceny do swojego konwencjonalnego odpowiednika, objętość bioreaktora musiałaby zostać zwiększona do takich wielkości, jakie są obecnie wykorzystywane w produkcji bakterii fermentujących lub innych produktów spożywczych przemysłu biotechnologicznego – 100-1000 m^3[54]. Zwiększenie objętości samego naczynia reakcyjnego może nie wpłynąć znacząco na redukcję kosztów, jako że koszt urządzeń wykorzystywanych do produkcji stanowi małą część całkowitej inwestycji, więc wielkość pojedynczego bioreaktora nie zwiększa znacząco opłacalności procedury. Zwiększenie liczby mniejszych naczyń reakcyjnych bioreaktora może okazać się jednak korzystne, ze względu na redukcję ryzyka kontaminacji, jak również z powodu łatwiejszej optymalizacji prowadzonego procesu hodowli [100]. Czynnikiem, który najbardziej ogranicza zwiększenie skali jest wrażliwość komórek na uszkodzenia mechaniczne. Z tego względu, konieczne jest zminimalizowanie naprężenia ścinającego poprzez zastosowanie małych obrotów mieszadła oraz wolnego tempa napowietrzania. Brak odpowiedniego ruchu w bioreaktorze prowadzi jednak do słabego mieszania i tym samym do niewystarczającego transferu mas i wymusza zastosowanie większego stężenia tlenu, co skutkuje ostatecznie także większym stężeniem CO_2. Obecność tego gazu obniża pH mieszaniny, co negatywnie wpływa na komórki w naczyniu reakcyjnym. Wrażliwość miocytów uniemożliwia także podwyższenie temperatury, co mogłoby pomóc w transferze mas [44]. W 2020 r. opracowano bioreaktor z podnośnikiem powietrznym o ob-



RYCINA 4. Schemat działania bioreaktora opatentowanego przez Future Meat Technologies (patent WO2018011805A9) z dwoma obiegami i automatyczną kontrolą pH, temperatury, poziomu glukozy i białka. Obieg 1: utrzymujący stałe ciepło z medium natlenowanym i wzbogacanym w CO_2 i N_2, z usunięciem pęcherzyków powietrza. Obieg 2: oparty o system dializacyjny i filtrujący ma na celu usuwanie toksycznych związków, zwłaszcza amoniaku, uzupełnianie nutrientów – aminokwasów i czynników wzrostu (insuliny) i wprowadzania medium z powrotem do bioreaktora. System filtrujący nie usuwa albuminy, która jest transporterem dla nutrientów, kwasów tłuszczowych i czynników wzrostu

FIGURE 4. Schematic illustration of bioreactor patented by the Future Meat Technologies (patent WO2018011805A9) with two circuits, automatic control of pH, temperature, glucose and protein level. Circuit A maintains constant heat with an oxygenated medium enriched with CO_2 and N_2, and removes air bubbles. Circuit B: based on a dialysis and filtration system, its purpose is to remove toxic compounds, especially ammonia, replenish nutrients – amino acids and growth factors (insulin) and return the medium to the bioreactor. The filtration system does not remove albumin, a transporter for nutrients, fatty acids and growth factors

jętości 300 m^3 i dzięki zastosowaniu obliczeniowej mechaniki płynów udało się ustalić geometrię naczynia reakcyjnego tak, aby zapewnić odpowiedni przepływ masy, przy optymalnych dla komórek zwierzęcych parametrach mieszania i rozproszenia energii [54]. Kwestia zwiększenia skali procesu produkcji mięsa *in vitro* jest obecnie największym wyzwaniem i wymaga dobrej optymalizacji tak, aby móc jak najszybciej przejść do komercjalizacji produktu. Przykładowym roz-

wiązaniem, wykorzystywanym w praktyce, jest bioreaktor opatentowany przez Future Meat Technologies (patent WO2018011805A9) z dwoma obiegami i automatyczną kontrolą pH, temperatury, poziomu glukozy i białka (**Ryc. 4**).

WYKORZYSTANIE TECHNOLOGII BIOPRINTINGU 3D

Bioprinting jest relatywnie nową i zaawansowaną techniką inżynierii tkankowej. Polega na wykorzystaniu zawiesiny komórkowej z hydrożelem jako biotuszu i odpowiednim rozmieszczeniu go w formie kolejnych warstw, do uzyskania pożądanej struktury 3D [44]. Stworzone w ten sposób tkanki imitują te występujące *in vivo* nie tylko poprzez wygląd zewnętrzny i skład komórkowy, ale także poprzez odpowiednie unaczynienie [8]. Bioprinting może przyjąć formę ekstruzji, drukowania kropelkowego lub drukowania za pomocą lasera [22]. Drukowanie metodą ekstruzji polega na depozycie biotuszu w formie ciągłego filamentu, zaś drukowanie kropelkowe opiera się na odpowiedniej dystrybucji kropli biotuszu, za pomocą temperatury lub impulsu elektrycznego. Drukowanie za pomocą lasera wykorzystuje zjawisko fotopolimeryzacji, może być też wykorzystywane do precyzyjnego pozycjonowania komórek w produkcie za pomocą techniki LIFT (ang. *Laser-Induced Forward Transfer*, transfer do przodu indukowany laserowo). W 2020 r. zespół Kupfer i in. wykorzystał technikę bioprintingu laserowego do stworzenia serca *in vitro* [51]. Jako biotusz, wykorzystane zostały kardiomiocyty otrzymane z ludzkich iPSC z fotosieciowanymi białkami macierzy zewnątrzkomórkowej jako łącze. Otrzymana pompa mięśniowa wykazywała pełen potencjał do skurczu i reagowała na stymulację i wykazywała ciągły potencjał czynnościowy regulowany przez odpowiednią stymulację i leki, co może sugerować, że stworzony w ten sposób mięsień również będzie zachowywał odpowiednie funkcje. Z uwagi na charakterystykę tkanki mięśniowej, metody ekstruzji i drukowania kropelkowego mogą okazać się najbardziej korzystne. Duża kontrola nad układem i składem powstającej tkanki może znacząco obniżyć koszty produkcji mięsa [80].

ZALETY, WYZWANIA I PERSPEKTYWY

Do najważniejszych zalet związanych z pozaustrojową produkcją mięsa należą:

- ograniczenie emisji gazów cieplarnianych (aspekt środowiskowy) [59, 89]
- ograniczenie zużycia wody (aspekt środowiskowy) [59, 89]
- ograniczenie deforestacji (aspekt środowiskowy) [2, 59, 89]
- ograniczenie emisji pestycydów i nawozów rolniczych (aspekt środowiskowy) [2]

- eliminacja użycia antybiotyków w procesie produkcji mięsa (aspekt zdrowotny) dzięki zastosowaniu w pełni lub częściowo zautomatyzowanych systemów hodowli, przestrzegania reżimu sanitarnego, stosowania filtrów HEPA i promieniowania UV-C [52]
- ograniczenie ryzyka zoonoz związanych z kontaktem ze zwierzętami dzikimi i hodowlanymi (aspekt zdrowotny) [37, 73]
- przewidywalna i szybka produkcja (aspekt bezpieczeństwa żywnościowego)
- ograniczenie/brak cierpienia zwierząt (aspekt etyczny) [75]

TABELA 1. Liderzy rozwoju technologii pozaustrojowej produkcji mięsa na cele konsumpcyjne
TABLE 1. The most important companies involved in cultured meat production

Startup/firma	Kraj pochodzenia	Główny produkt
Finless Foods	USA	Mięso ryb
Just	USA	Drób, wołowina
Memphis Meats	USA	Drób, wołowina
Blue Nalu	USA	Mięso ryb
Because Animals	USA	Produkty mięsne dla psów i kotów (m.in. mięso myszy)
Mission Barns	USA	Drób, wieprzowina
Wild Type	USA	Mięso ryb
Aleph Farms	Izrael	Wołowina
Future Meat Technologies	Izrael	Drób, wołowina, baranina
SuperMeat	Izrael	Drób
Mosa Meat	Holandia	Wołowina
Biftek	Turcja	Wołowina
Integriculture	Japonia	Wołowina, drób, foie gras
Shiok Meats	Singapur	Mięso krewetek, krabów i homarów

Jednym z największych problemów technologii mięsa in vitro jest fakt, że jest to relatywnie nowa dziedzina– metody nie są jeszcze odpowiednio zoptymalizowane i przetestowane, a pożywki i suplementy używane w hodowli nie są wystandaryzowane. Przekładać może się to na mniejszą konsumencką akceptację produktów żywnościowych wytworzonych w ten sposób [80]. W dobie rosnące-

go zapotrzebowania na optymalne źródło białka, związane z rosnącą populacją ludzką, mięso in vitro nadal pozostaje jednak jednym z najbardziej obiecujących alternatyw. Szacuje się, że globalny rynek alternatyw białka zwierzęcego, do 2025 r. wart będzie 17.9 mld USD [62]. Zgodnie z danymi Good Food Institute, amerykańscy inwestorzy, w ciągu ostatniej dekady, przeznaczyli łącznie 16 mld USD firmom i startupom zajmującym się produkcją mięsa in vitro, z czego ok. 13 mld USD tylko w latach 2017-2018 [77]. Firmy takie jak MosaMeat, Memphis Meat, Finless Foods, czy Supermeat, oprócz optymalizacji procesu produkcji, inwestują w komercjalizację swoich produktów. Warto zauważyć, że technologia pozaustrojowego pozyskiwania mięsa rozwijana jest niemal wyłącznie przy udziale środków finansowych pochodzących od prywatnych inwestorów (**Tab. 1**).

Akceptacja konsumentów jest szczególnie ważnym aspektem wprowadzenia na rynek mięsnych produktów pozyskiwanych pozaustrojowo. Według badań opinii publicznej, istotne jest samo nazewnictwo – terminy takie jak „mięso *in vitro*", „mięso sztuczne", mięso laboratoryjne" budzą negatywne skojarzenia [79]. Jednym z proponowanych rozwiązań jest zmiana nazwy na „mięso hodowane" (ang. *cultured meat*), "czyste mięso" (ang. *clean meat*) lub „mięso pozbawione cierpienia" (ang. *slaughter-free meat*) – odpowiednie nazewnictwo może pomóc budować bardziej pozytywne skojarzenia [12]. Oprócz tego, sugeruje się, że na lepszy odbiór może mieć wpływ także ograniczenie szczegółowości opisu używanej technologii podczas prezentacji produktu [78].

PODSUMOWANIE

Omówione w niniejszej pracy procesy mogą zostać zastosowane zarówno do wytworzenia mięsa zwierząt hodowlanych, jak i gatunków dziko występujących, w tym gatunków rzadkich, dostępnych lokalnie lub zagrożonych wyginięciem. Wykorzystując techniki hodowli komórkowej i inżynierii tkankowej możliwe jest uzyskanie zarówno mięsa konsumowanego przez człowieka, jak również karmy dla zwierząt domowych – psów i kotów. Technologia ta jest również obiecująca w kontekście planów eksploracji kosmosu z udziałem misji załogowych, zwłaszcza związanych z Marsem. Postęp naukowo-technologiczny, potrzeba zapewnienia bezpieczeństwa klimatycznego i żywnościowego, jak również rosnąca, zwłaszcza pośród osób młodych, świadomość ekologiczna, tworzą optymalne warunki dla rozwoju i komercjalizacji produkcji pozaustrojowego mięsa. Wszystko wskazuje, iż w XXI w. zrealizowany zostanie, wyrażony w 1931 r., postulat Winstona Churchilla: „*Powinniśmy porzucić absurdalną hodowlę żywych kurczaków prowadzoną tylko po to, by zjeść skrzydełko czy pierś, na korzyść osobnej hodowli tych części w specjalnej pożywce*" [17].

LITERATURA

[1] AHMAD RS, IMRAN AHUSSAIN MB, Nutritional composition of meat. *Meat science and nutrition* 2018; **4**.

[2] ALEXANDER P, BROWN C, ARNETH A, DIAS C, FINNIGAN J, MORAN DROUNSEVELL MDA, Could consumption of insects, cultured meat or imitation meat reduce global agricultural land use? *Global Food Security* 2017; **15**: 22-32.

[3] AMIT M, CARPENTER MK, INOKUMA MS, CHIU CP, HARRIS CP, WAKNITZ MA, ITSKOVITZ-ELDOR JTHOMSON JA, Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; **227**: 271-8.

[4] BENJAMINSON MA, GILCHRIEST JALORENZ M, In vitro edible muscle protein production system (mpps): stage 1, fish. *Acta Astronautica* 2002; **51**: 879-889.

[5] BENNETT AJ, PASKEY AC, EBINGER A, PFAFF F, PRIEMER G, HÖPER D, BREITHAUPT A, HEUSER E, ULRICH RG, KUHN JH, BISHOP-LILLY KA, BEER MGOLDBERG TL, Relatives of rubella virus in diverse mammals. *Nature* 2020; **586**: 424-428.

[6] BENTZINGER CF, WANG YXRUDNICKI MA, Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2012; **4**: a008342.

[7] BHAT ZFHINA B, Animal-free meat biofabrication. *American Journal of Food Technology* 2011; **6**: 441-459.

[8] BHAT ZF, KUMAR SBHAT HF, In vitro meat: A future animal-free harvest. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; **57**: 782-789.

[9] BHAT ZF, KUMAR SFAYAZ H, In vitro meat production: Challenges and benefits over conventional meat production. *Journal of Integrative Agriculture* 2015; **14**: 241-248.

[10] BORENSTEIN JT, TERAI H, KING KR, WEINBERG EJ, KAAZEMPUR-MOFRAD MRVACANTI JP, Microfabrication Technology for Vascularized Tissue Engineering. *Biomedical Microdevices* 2002; **4**: 167-175.

[11] BREWER MS, ZHU LGMCKEITH FK, Marbling effects on quality characteristics of pork loin chops: consumer purchase intent, visual and sensory characteristics. *Meat Sci* 2001; **59**: 153-63.

[12] BRYANT CJBARNETT JC, What's in a name? Consumer perceptions of in vitro meat under different names. *Appetite* 2019; **137**: 104-113.

[13] CAMPION DR, The muscle satellite cell: a review. *Int Rev Cytol* 1984; **87**: 225-51.

[14] CHA JM, PARK S-N, NOH SHSUH H, Time-dependent Modulation of Alignment and Differentiation of Smooth Muscle Cells Seeded on a Porous Substrate Undergoing Cyclic Mechanical Strain. *Artificial Organs* 2006; **30**: 250-258.

[15] CHEN G, USHIDA TTATEISHI T, Scaffold Design for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience* 2002; **2**: 67-77.

[16] CHEN Z, LUCKAY A, SODORA DL, TELFER P, REED P, GETTIE A, KANU JM, SADEK RF, YEE J, HO DD, ZHANG LMARX PA, Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Virol* 1997; **71**: 3953-60.

[17] CHURCHILL W, Fifty Years Hence. *Strand Magazine* 1931.

[18] COLLIGNON PJMCEWEN SA, One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Tropical medicine and infectious disease* 2019; **4**: 22.

[19] DATAR IBETTI M, Possibilities for an in vitro meat production system. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2010; **11**: 13-22.

[20] DE DEYNE PG, Formation of sarcomeres in developing myotubes: role of mechanical stretch and contractile activation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; **279**: C1801-11.

[21] DENNIS RG, KOSNIK PE, 2nd, GILBERT MEFAULKNER JA, Excitability and contractility of skeletal muscle engineered from primary cultures and cell lines. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; **280**: C288-95.

[22] DEY MOZBOLAT IT, 3D bioprinting of cells, tissues and organs. *Scientific Reports* 2020; **10**: 14023.
[23] DING S, SWENNEN GNM, MESSMER T, GAGLIARDI M, MOLIN DGM, LI C, ZHOU GPOST MJ, Maintaining bovine satellite cells stemness through p38 pathway. *Scientific Reports* 2018; **8**: 10808.
[24] DODSON MV, MARTIN EL, BRANNON MA, MATHISON BAMCFARLAND DC, Optimization of bovine satellite cell-derived myotube formation in vitro. *Tissue Cell* 1987; **19**: 159-66.
[25] EDELMAN PD, MCFARLAND DC, MIRONOV VAMATHENY JG, Commentary: In vitro-cultured meat production. *Tissue Eng* 2005; **11**: 659-62.
[26] EDWARDS CE, YOUNT BL, GRAHAM RL, LEIST SR, HOU YJ, DINNON KH, SIMS AC, SWANSTROM J, GULLY K, SCOBEY TD, COOLEY MR, CURRIE CG, RANDELL SHBARIC RS, Swine acute diarrhea syndrome coronavirus replication in primary human cells reveals potential susceptibility to infection. *PNAS* 2020; **117**: 26915-26925.
[27] EFSA, Re-evaluation of alginic acid and its sodium, potassium, ammonium and calcium salts (E 400-E 404) as food additives. *EFSA Journal* 2017; **15**: e05049.
[28] EZASHI T, TELUGU BPVL, ALEXENKO AP, SACHDEV S, SINHA SROBERTS RM, Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; **106**: 10993.
[29] FAO, The State of Food and Agriculture. 2014: http://www.fao.org/3/i4040e/i4040e.pdf.
[30] FAROKHI M, JONIDI SHARIATZADEH F, SOLOUK AMIRZADEH H, Alginate Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering: A Review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2020; **69**: 230-247.
[31] FONG IW, Animals and Mechanisms of Disease Transmission. *Emerging Zoonoses: A Worldwide Perspective* 2017: 15-38.
[32] FORTIER M, COMUNALE F, KUCHARCZAK J, BLANGY A, CHARRASSE SGAUTHIER-ROUVIÈRE C, RhoE controls myoblast alignment prior fusion through RhoA and ROCK. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 1221-31.
[33] FURUHASHI M, MORIMOTO Y, SHIMA A, NAKAMURA F, ISHIKAWA HTAKEUCHI S, Formation of contractile 3D bovine muscle tissue for construction of millimetre-thick cultured steak. *npj Science of Food* 2021; **5**: 6.
[34] GARCÍA-ROJAS P, ANTARAMIAN A, GONZÁLEZ-DÁVALOS L, VILLARROYA F, SHIMADA A, VARELA-ECHAVARRÍA AMORA O, Induction of peroxisomal proliferator-activated receptor gamma and peroxisomal proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 by unsaturated fatty acids, retinoic acid, and carotenoids in preadipocytes obtained from bovine white adipose tissue1,2. *J Anim Sci* 2010; **88**: 1801-8.
[35] GRINNELL F, Fibroblast–collagen-matrix contraction: growth-factor signalling and mechanical loading. *Trends in Cell Biology* 2000; **10**: 362-365.
[36] GUO L, LI XTANG Q-Q, Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: a central role for CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β. *The Journal of biological chemistry* 2015; **290**: 755-761.
[37] HALABOWSKI DRZYMSKI P, Taking a lesson from the COVID-19 pandemic: Preventing the future outbreaks of viral zoonoses through a multi-faceted approach. *Science of The Total Environment* 2020: 143723.
[38] HAUSER N, GUSHIKEN AC, NARAYANAN S, KOTTILIL SCHUA JV, Evolution of Nipah Virus Infection: Past, Present, and Future Considerations. *Trop Med Infect Dis* 2021; **6**.
[39] HAYMAN DT, YU M, CRAMERI G, WANG LF, SUU-IRE R, WOOD JLCUNNINGHAM AA, Ebola virus antibodies in fruit bats, Ghana, West Africa. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**: 1207-9.
[40] HELLIWELL RBURTON RJF, The promised land? Exploring the future visions and narrative silences of cellular agriculture in news and industry media. *Journal of Rural Studies* 2021; **84**: 180-191.
[41] HILL ABT, BRESSAN FF, MURPHY BDGARCIA JM, Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species. *Stem Cell Research & Therapy* 2019; **10**: 44.

[42] JOCHEMS CE, VAN DER VALK JB, STAFLEU FRBAUMANS V, The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim* 2002; **30**: 219-27.
[43] JUN I, JEONG SSHIN H, The stimulation of myoblast differentiation by electrically conductive sub-micron fibers. *Biomaterials* 2009; **30**: 2038-47.
[44] JUNG JW, LEE J-SCHO D-W, Computer-aided multiple-head 3D printing system for printing of heterogeneous organ/tissue constructs. *Scientific Reports* 2016; **6**: 21685.
[45] KADIM IT, MAHGOUB O, BAQIR S, FAYE BPURCHAS R, Cultured meat from muscle stem cells: A review of challenges and prospects. *Journal of Integrative Agriculture* 2015; **14**: 222-233.
[46] KANATOUS SBMAMMEN PPA, Regulation of myoglobin expression. *The Journal of experimental biology* 2010; **213**: 2741-2747.
[47] KAZAMA T, FUJIE M, ENDO TKANO K, Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can transdifferentiate into skeletal myocytes in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; **377**: 780-785.
[48] KHADEMHOSSEINI A, VACANTI JPLANGER R, Progress in tissue engineering. *Sci Am* 2009; **300**: 64-71.
[49] KLIMASZYK PRZYMSKI P, *Water and Aquatic Fauna on Drugs: What are the Impacts of Pharmaceutical Pollution?*, in *Water Management and the Environment: Case Studies*, M. Zelenakova, Editor. 2018, Springer International Publishing: Cham. p. 255-278.
[50] KOLKMANN AM, POST MJ, RUTJENS MAM, VAN ESSEN ALMMOUTSATSOU P, Serum--free media for the growth of primary bovine myoblasts. *Cytotechnology* 2020; **72**: 111-120.
[51] KUPFER ME, LIN WH, RAVIKUMAR V, QIU K, WANG L, GAO L, BHUIYAN DB, LENZ M, AI J, MAHUTGA RR, TOWNSEND D, ZHANG J, MCALPINE MC, TOLKACHEVA EGOGLE BM, In Situ Expansion, Differentiation, and Electromechanical Coupling of Human Cardiac Muscle in a 3D Bioprinted, Chambered Organoid. *Circ Res* 2020; **127**: 207-224.
[52] LEHMANN R, SEVERITT JC, RODDELKOPF T, JUNGINGER STHUROW K, Biomek Cell Workstation:A Variable System for Automated Cell Cultivation. 2016; **21**: 439-450.
[53] LI MIKEHARA S, Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. *Stem cells international* 2013; **2013**: 132642-132642.
[54] LI X, ZHANG G, ZHAO X, ZHOU J, DU GCHEN J, A conceptual air-lift reactor design for large scale animal cell cultivation in the context of in vitro meat production. *Chemical Engineering Science* 2020; **211**: 115269.
[55] LIM MJ, CHOI KJ, DING Y, KIM JH, KIM BS, KIM YH, LEE J, CHOE W, KANG I, HA J, YOON KSKIM SS, RhoA/Rho kinase blocks muscle differentiation via serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and -2. *Mol Endocrinol* 2007; **21**: 2282-93.
[56] MACKEY AL, MAGNAN M, CHAZAUD BKJAER M, Human skeletal muscle fibroblasts stimulate in vitro myogenesis and in vivo muscle regeneration. *J Physiol* 2017; **595**: 5115-5127.
[57] MAJOREK KA, POREBSKI PJ, DAYAL A, ZIMMERMAN MD, JABLONSKA K, STEWART AJ, CHRUSZCZ MMINOR W, Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol Immunol* 2012; **52**: 174-82.
[58] MANN A, YADAV RP, SINGH J, KUMAR D, SINGH BYADAV PS, Culture, characterization and differentiation of cells from buffalo (Bubalus bubalis) amnion. *Cytotechnology* 2013; **65**: 23-30.
[59] MATTICK CS, LANDIS AEALLENBY BR, A case for systemic environmental analysis of cultured meat. *Journal of Integrative Agriculture* 2015; **14**: 249-254.
[60] MAURO A, Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; **9**: 493-5.
[61] MCFARLAND DC, DOUMIT MEMINSHALL RD, The turkey myogenic satellite cell: Optimization of in vitro proliferation and differentiation. *Tissue and Cell* 1988; **20**: 899-908.
[62] METICULOUS MARKET RESEARCH, *Alternative Protein Market -Global Opportunity Analysis and Industry Forecast (2020-2027)* 2020: Market Data Forecast, India.
[63] MIZUNO Y, CHANG H, UMEDA K, NIWA A, IWASA T, AWAYA T, FUKADA S, YAMAMOTO H, YAMANAKA S, NAKAHATA THEIKE T, Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *Faseb j* 2010; **24**: 2245-53.

[64] MOULY V, AAMIRI A, BIGOT A, COOPER RN, DI DONNA S, FURLING D, GIDARO T, JACQUEMIN V, MAMCHAOUI K, NEGRONI E, PÉRIÉ S, RENAULT V, SILVA-BARBOSA SDBUTLER-BROWNE GS, The mitotic clock in skeletal muscle regeneration, disease and cell mediated gene therapy. *Acta Physiol Scand* 2005; **184**: 3-15.
[65] O'NEILL EN, COSENZA ZA, BAAR KBLOCK DE, Considerations for the development of cost-effective cell culture media for cultivated meat production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2021; **20**: 686-709.
[66] PANDURANGAN MKIM DH, A novel approach for in vitro meat production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; **99**: 5391-5.
[67] POORE JNEMECEK T, Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science* 2018; **360**: 987-992.
[68] POST MJ, Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects. *Meat Science* 2012; **92**: 297-301.
[69] POST MJ, HOCQUETTE JF, *Chapter 16 – New Sources of Animal Proteins: Cultured Meat*, in *New Aspects of Meat Quality*, P.P. Purslow, Editor. 2017, Woodhead Publishing. p. 425-441.
[70] POWELL RL, DODSON MVCLOUD JG, Cultivation and differentiation of satellite cells from skeletal muscle of the rainbow trout Salmo gairdneri. *Journal of Experimental Zoology* 1989; **250**: 333-338.
[71] RIPPLE WJ, WOLF C, NEWSOME TM, BARNARD PMOOMAW WR, World Scientists' Warning of a Climate Emergency. *BioScience* 2020; **70**: 8-12.
[72] ROOBROUCK VD, ULLOA-MONTOYA FVERFAILLIE CM, Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res* 2008; **314**: 1937-44.
[73] RZYMSKI P, KULUS M, JANKOWSKI M, DOMPE C, BRYL R, PETITTE JN, KEMPISTY BMOZDZIAK P, COVID-19 Pandemic Is a Call to Search for Alternative Protein Sources as Food and Feed: A Review of Possibilities. *Nutrients* 2021; **13**.
[74] SAWICKI W, Malejczyk J., *Histologia. 6th ed,*. 2012, Warszawa: PZWL.
[75] SCHAEFER GOSAVULESCU J, The Ethics of Producing In Vitro Meat. *Journal of applied philosophy* 2014; **31**: 188-202.
[76] SHARP PMHAHN BH, Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2011; **1**: a006841-a006841.
[77] SIEGNER C. *Could India become the next cell-cultured meat hub?* 2019; Available from: https://www.fooddive.com/news/could-india-become-the-next-cell-cultured-meat-hub/554578/.
[78] SIEGRIST MSÜTTERLIN B, Importance of perceived naturalness for acceptance of food additives and cultured meat. *Appetite* 2017; **113**: 320-326.
[79] SIEGRIST M, SÜTTERLIN BHARTMANN C, Perceived naturalness and evoked disgust influence acceptance of cultured meat. *Meat Science* 2018; **139**: 213-219.
[80] SINGH A, VERMA V, KUMAR M, KUMAR A, SARMA DK, SINGH BJHA R, Stem cells-derived in vitro meat: from petri dish to dinner plate. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2020: 1-14.
[81] SPECHT L, An analysis of culture medium costs and production volumes for cultivated meat. *The Good Food Institute: Washington, DC, USA* 2020.
[82] STANTON MM, TZATZALOS E, DONNE M, KOLUNDZIC N, HELGASON IILIC D, Prospects for the Use of Induced Pluripotent Stem Cells in Animal Conservation and Environmental Protection. *Stem cells translational medicine* 2019; **8**: 7-13.
[83] STEPHENS NRUIVENKAMP M, Promise and Ontological Ambiguity in the In vitro Meat Imagescape: From Laboratory Myotubes to the Cultured Burger. *Science as culture* 2016; **25**: 327-355.
[84] SUN H, XIAO Y, LIU J, WANG D, LI F, WANG C, LI C, ZHU J, SONG J, SUN H, JIANG Z, LIU L, ZHANG X, WEI K, HOU D, PU J, SUN Y, TONG Q, BI Y, CHANG K-C, LIU S, GAO GFLIU J, Prevalent Eurasian avian-like H1N1 swine influenza virus with 2009 pandemic viral genes facilitating human infection. 2020; **117**: 17204-17210.
[85] TAKAHASHI KYAMANAKA S, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; **126**: 663-76.

[86] TELUGU BP, PARK K-EPARK C-H, Genome editing and genetic engineering in livestock for advancing agricultural and biomedical applications. *Mammalian Genome* 2017; **28**: 338-347.
[87] TIZARD IR, Vaccination against coronaviruses in domestic animals. *Vaccine* 2020; **38**: 5123-5130.
[88] TROY A, CADWALLADER AB, FEDOROV Y, TYNER K, TANAKA KKOLWIN BB, Coordination of satellite cell activation and self-renewal by Par-complex-dependent asymmetric activation of p38α/β MAPK. *Cell Stem Cell* 2012; **11**: 541-53.
[89] TUOMISTO HLDE MATTOS MJ, Environmental impacts of cultured meat production. *Environ Sci Technol* 2011; **45**: 6117-23.
[90] WHO, *Human infection with avian influenza A(H5) viruses*, in *Avian Influenza Weekly Update*. 2021.
[91] WIEDŁOCHA A, NILSEN T, WESCHE J, SØRENSEN V, MAŁECKI J, MARCINKOWSKA EOLSNES S, Phosphorylation-regulated nucleocytoplasmic trafficking of internalized fibroblast growth factor-1. *Mol Biol Cell* 2005; **16**: 794-810.
[92] WILSCHUT KJ, JAKSANI S, VAN DEN DOLDER J, HAAGSMAN HPROELEN BA, Isolation and characterization of porcine adult muscle-derived progenitor cells. *J Cell Biochem* 2008; **105**: 1228-39.
[93] WOOD JD, RICHARDSON RI, NUTE GR, FISHER AV, CAMPO MM, KASAPIDOU E, SHEARD PRENSER M, Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Sci* 2004; **66**: 21-32.
[94] WOOLHOUSE MGAUNT E, Ecological origins of novel human pathogens. *Crit Rev Microbiol* 2007; **33**: 231-42.
[95] WORLD ECONOMIC FORUM. *Meat: The Future Series Alternative Proteins*. 2018; Available from: http://www3.weforum.org/docs/White_Paper_Meat_the_Future_Time_Protein_Portfolio_Meet_Tomorrow_Demand_report_2018.pdf.
[96] YABLONKA-REUVENI Z, QUINN LSNAMEROFF M, Isolation and clonal analysis of satellite cells from chicken pectoralis muscle. *Developmental biology* 1987; **119**: 252-259.
[97] YADAV PS, SINGH RKSINGH B, Fetal Stem Cells in Farm Animals: Applications in Health and Production. *Agricultural Research* 2012; **1**: 67-77.
[98] YOUNG JF, THERKILDSEN M, EKSTRAND B, CHE BN, LARSEN MK, OKSBJERG NSTAGSTED J, Novel aspects of health promoting compounds in meat. *Meat Science* 2013; **95**: 904-911.
[99] ZENG XRAO MS, Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement. *Neuroscience* 2007; **145**: 1348-58.
[100] ZHANG G, ZHAO X, LI X, DU G, ZHOU JCHEN J, Challenges and possibilities for bio-manufacturing cultured meat. *Trends in Food Science & Technology* 2020; **97**: 443-450.
[101] ZHANG Y, LI H, LIAN ZLI N, Myofibroblasts protect myoblasts from intrinsic apoptosis associated with differentiation via β1 integrin-PI3K/Akt pathway. *Dev Growth Differ* 2010; **52**: 725-33.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 20.05.2021
Przyjęto: 26.06.2021
Piotr Rzymski
Zakład Medycyny Środowiskowej,
Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań
tel.: (61) 854-76-04
e-mail: rzymskipiotr@ump.edu.pl

ANTRACYKLINY WE WSPÓŁCZESNEJ ONKOLOGII: MECHANIZM DZIAŁANIA, TOKSYCZNOŚĆ, MOŻLIWOŚCI TERAPEUTYCZNE

ANTHRACYCLINES IN A MODERN ONCOLOGY: MECHANISM OF ACTION, TOXICITY AND THERAPEUTIC POTENTIAL

Anna MRÓZ, Dominika MIODOWSKA, Aleksandra MURZYN, Natalia OBAJTEK, Patrycja BOJDO, Justyna ORZEŁ, Karolina RAJEK, Agnieszka TATARUCH, Kamil PISKA, Elżbieta PĘKALA

Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Streszczenie: Antracykliny to substancje o ugruntowanej pozycji w farmakoterapii onkologicznej. Chociaż są uznawane za leki niezwykle skuteczne, to możliwość ich stosowania jest ograniczona przez kardiotoksyczność i oporność wielolekową. Obecnie prowadzone są liczne badania w kierunku nowych pochodnych antracyklinowych, które odznaczałyby się jeszcze większym działaniem przeciwnowotworowym przy jednocześnie mniejszej toksyczności. Poniższa praca skupia się na przeglądzie antybiotyków antracyklinowych, zarówno starszej generacji, jak i nowszych pochodnych, o mniejszym potencjale uszkadzającym serce, ze zwróceniem szczególnej uwagi na poznane mechanizmy działania przeciwnowotworowego oraz kardiotoksyczność i mechanizm jej powstawania.

Słowa kluczowe: antracykliny, rak, kardiotoksyczność

Summary: Anthracyclines are substances with an established position in oncological pharmacotherapy. Although they are considered to be extremely effective drugs, their applicability is limited by cardiotoxicity and multi-drug resistance. Currently, numerous studies are being carried out to find new anthracycline derivatives, which would be characterized by an even greater anti-cancer effect with lower toxicity. The following work focuses on a review of both, the older generation and newer anthracycline antibiotics, with a lower heart-damaging potential, paying particular attention to the known mechanisms of action, cardiotoxicity, and the mechanism of its formation.

Keywords: anthracyclines, cancer, cardiotoxicity

WSTĘP

Choroby nowotworowe stanowią problem cywilizacyjny, wymuszający prężny rozwój nowych, skutecznych środków terapeutycznych. Istnieje wiele kategorii leków stosowanych w onkologii, z których jedną z kluczowych są antracykliny. Geneza antybiotyków antracyklinowych sięga lat 60, kiedy to ze szczepu bakterii *Streptomyces peucetius* wyizolowano daunorubicynę, a następnie ze zmutowanej odmiany *caesius* – doksorubicynę, która posiada dodatkową grupą hydroksylową. Po odkryciu pierwszych antybiotyków antracyklinowych zaczęto poszukiwania nowych analogów, co zaowocowało licznymi badaniami i wprowadzeniem do lecznictwa kolejnych leków, w tym epirubicyny i idarubicyny. Mechanizm działania tych leków opiera się na hamowaniu na aktywności topoziomerazy II oraz oddziaływaniu z DNA poprzez interkalacje. Spektrum działania antracyklin jest bardzo szerokie, jednak w wielu przypadkach cechą ograniczającą stosowanie, są poważne działania niepożądane – często występująca mielosupresja i kardiotoksyczność. O ile w przypadku mielosupresji można wdrożyć leczenie cytokinami, tak kardiotoksyczność nadal stanowi poważny problemem w leczeniu antybiotykami antracyklinowymi. Pomimo wielu wspólnych właściwości, poszczególne antracykliny posiadają swoje unikatowe cechy. Obecnie znane są pochodne zarówno stosowane w leczeniu klinicznym, jak i związki wykorzystywane w badaniach eksperymentalnych. Obecnie ciągle poszukuje się nowych analogów daunorubicyny, optymalizując parametry cząsteczek, dążąc do otrzymania kandydata na lek, który cechowałby się obniżoną toksycznością, głównie kardiotoksycznością, oraz wysoką skutecznością.

ANTRACYKLINY – MECHANIZM DZIAŁANIA

Mechanizm działania warunkujący cytotoksyczność antracyklin jest złożony. Dowiedziono, że antracykliny odgrywają rolę w indukcji apoptozy poprzez aktywację czynników proapoptotycznych. Dla przykładu, doksorubicyna aktywuje kinazę p38 aktywowaną mitogenami (MAPK) lub hamuje szlak kinazy fosfatydyloinozytolu PI3K/Akt. Udowodniono, że reakcja ta powoduje zwiększenie wrażliwości komórek nowotworowych na apoptozę indukowaną doksorubicyną. Ponadto substancje te w wieloraki sposób wpływają na strukturę DNA, m.in. poprzez zaburzenie aktywności topoizomerazy II, prowadzące to do zahamowania replikacji bądź transkrypcji DNA. Równie istotne są: interkalacja DNA, powodująca zahamowanie syntezy kwasów nukleinowych oraz tworzenie się wolnych rodników, uszkadzających podwójną helisę [61, 91].

Za najważniejszy mechanizm antracyklin uznaje się hamowanie aktywności topoizomerazy II. Jest to enzym biorący udział w procesach replikacji, transkrypcji oraz naprawy DNA. Ma za zadanie przecinać obie nici DNA jednocześnie, wią-

żąc końce 5'-fosfodeoksyrybozylowe z podjednostkami enzymu. Na tym etapie antracyklina przyłącza się do topoizomerazy II i tworzy kompleks topoizomeraza II – antracyklina – DNA. Kompleks stabilizowany jest przez zewnętrzne podstawniki antracykliny, m.in. resztę cukrową, której obecność ma kluczowe znaczenie dla oddziaływania substancji z enzymem. Kompleks uniemożliwia w ten sposób ponowne połączenie się nici DNA. Proces ten prowadzi do fragmentacji DNA, co stanowi przyczynę apoptozy komórki. W zależności od rodzaju antracykliny, proces ten może mieć różną skuteczność [10, 20, 36, 91].

Proces interkalacji DNA polega na tworzeniu kompleksów interkalacyjnych poprzez połączenie się antracykliny z DNA w miejscu sekwencji 5'-GC-3', 5'-CG-3', co wykazano w badaniach krystalograficznych. Płaski układ aromatyczny leku przyłącza się pomiędzy parami zasad z aminocukrem położnym w rowku mniejszym DNA, tworząc wiązanie kowalencyjne (N-C-N) z grupą aminową 2-N guaniny. Stabilizację układu zapewniają wiązania wodorowe, a ich tworzenie jest możliwe ze względu na obecność grupy hydroksylowej w pozycji C-9. Interkalację antracyklin do DNA stabilizują również siły van der Waalsa oraz wiązania jonowe. W wyniku interkalacji dochodzi do wydłużenia helisy DNA – odległość między sąsiadującymi parami zasad zwiększa się z 3,4 Å do 6,8 Å, przy czym maleje jej elastyczność. Zmniejsza się również kąt skręcenia płaszczyzny sąsiadujących zasad, w przypadku zastosowania daunorubicyny jest to zmiana o 11°. Skutkiem tego procesu jest rozluźnienie struktury DNA i zniekształcenie podwójnej helisy. Dochodzi do zahamowania procesu replikacji DNA [17, 73, 91].

Ponadto, niektóre antracykliny, m.in. doksorubicyna, mają możliwość łączenia się z DNA za pośrednictwem wiązań kowalencyjnych z udziałem formaldehydu. Formaldehyd w warunkach *in vivo* może powstać w reakcji Bayera Villigera oraz w wyniku utleniania poliamin wiązanych z DNA, np. sperminy przez rodniki hydroksylowe. Zdolność doksorubicyny do tworzenia wiązań z jonami Fe^{3+} oraz do indukcji powstawania reaktywnych form ma wpływ na tworzenie się wiązań kowalencyjnych. Wykazano również wysoką cytotoksyczność koniugatów doksorubicyny, epirubicyny i daunorubicyny z formaldehydem w komórkach nowotworowych, w tym opornych na antracykliny [92].

Jeżeli interkalacja zachodzi w sekwencji 5'-NGC-3', lek interkaluje pomiędzy guaninę (G), a dowolny nukleotyd (N), tworząc wiązania kowalencyjne z guaniną jednej nici DNA. Jednocześnie powstają oddziaływania z guaniną nici komplementarnej [93].

Antracykliny powodują uszkodzenia DNA również za pośrednictwem reaktywnych form tlenu. Ich produkcja zachodzi głównie w dwóch szlakach przemian, z których pierwszy związany jest z budową cząsteczek antracyklin. Posiadają one bowiem w swojej strukturze ugrupowanie chinonowe, podatne na redukcję do rodnika semichinonowego pod wpływem oksydoreduktaz komórkowych. Proces ten katalizowany jest przez dehydrogenazę NADH, czyli kompleks I łańcucha

transportu elektronów. Powstający rodnik semichinonowy w obecności tlenu cząsteczkowego jako związek nietrwały, ulega samoistnej reakcji utleniania z utworzeniem wyjściowej antracykliny oraz anionorodnika ponadtlenkowego, który przekształcany jest następnie do nadtlenku wodoru i rodnika hydroksylowego [8, 61, 78]. Drugi mechanizm związany jest ze zdolnością antracyklin do tworzenia kompleksów z żelazem. Badania wykazały, że powstałe kompleksy gromadzą się głównie w mitochondriach, zwiększając tym samym stężenie żelaza w tych organellach komórkowych i prowadząc do wytwarzania reaktywnych form tlenu w wyniku cyklicznego utleniania i redukcji jonów żelaza [45].

KARDIOTOKSYCZNOŚĆ

Niezmiennie istotnym ograniczeniem stosowania antracyklin w terapii przeciwnowotworowej jest ich działanie kardiotoksyczne. Efekt ten wykazuje różne nasilenie, a postępujące i długotrwałe upośledzenie kurczliwości mięśnia sercowego może ostatecznie doprowadzić do niewydolności serca. Obecnie klasyfikacje kardiotoksyczności dzielą ją na wczesną (w ciągu 2 tygodni po podaniu antracyklin; objawy zaburzenia rytmu serca), chroniczną wczesną (w przeciągu roku od rozpoczęcia leczenia) i chroniczną późną (objawy kilka lat po rozpoczęciu leczenia; najczęściej już z rozwiniętą niewydolnością serca) [56, 69]. Sugeruje się jednak, że należy traktować ją jako ciągły proces, którego kliniczne ujawnienie się może nastąpić w różnym czasie [16].

Działanie kardiotoksyczne zależy od rodzaju zastosowanej antracykliny, wysokości stosowanych pojedynczych dawek leku, jak i kumulacyjnej dawki [4]. Szansa wystąpienia kardiotoksyczności dodatkowo wzrasta przy obecności innych czynników ryzyka. Wśród nich wskazuje się bardzo młody (poniżej 4. r.ż.), jak i starszy wiek (powyżej 65. r.ż.), płeć żeńską, współistniejące choroby sercowo-naczyniowe (np. nadciśnienie tętnicze), równolegle prowadzoną radioterapię w obrębie klatki piersiowej, czy też równoczesne stosowanie innych leków (np. trastuzumab) [4, 67, 81]. Trwają również badania nad zidentyfikowaniem, jaką rolę pełnią geny we wzroście ryzyka kardiotoksyczności [8].

Niezbędne jest właściwe i efektywne monitorowanie funkcji serca u wszystkich pacjentów stosujących terapię antracyklinami. Diagnostyka oparta na objawach klinicznych, wskazujących na niewydolność serca, utrudnia wystarczająco wczesne wykrycie uszkodzeń i tym samym wprowadzenie odpowiedniej farmakoterapii. Bardziej efektywne jest obserwowanie wartości frakcji wyrzutowej lewej komory (ang. *left ventricular ejection fraction*, LVEF). Obecne badania sugerują, że najwcześniejsze uszkodzenia serca mogą być zdiagnozowane dzięki oznaczeniom biomarkerów, takich jak: troponina sercowa T (cTnT), czy mózgowy peptyd natriuretyczny (BNP), jednak mogą być one niewystarczające przy samodzielnym zastosowaniu [15, 18, 57, 94].

Poszukiwane są różne metody zmniejszania stopnia kardiotoksyczności antracyklin. Inhibitory konwertazy angiotensyny (ACEI) są stosowane w terapii m.in. niewydolności serca, a ich rolę w zapobieganiu kardiotoksyczności wykazano w badaniach (np. enalapril) [37, 99]. Wskazuje się również na β-blokery, takie jak karwedilol czy nebiwolol [5, 49]. Deksrazoksan to związek zarejestrowany przez FDA, a jego działanie kardioprotekcyjne w głównej mierze wiąże się ze zmniejszeniem ekspresji genu topoizomerazy typu II. Skutkuje to niższymi poziomami tego enzymu, dzięki czemu późniejsze podanie antracyklin powoduje mniej uszkodzeń DNA niż w obecności normalnego poziomu TopIIβ. Mechanizmowi działania, polegającemu na hamowaniu chelatowania żelaza przez antracykliny i w konsekwencji zapobieganiu tworzenia się reaktywnych form tlenu, przypisuje się drugorzędną rolę ze względu na niejednoznaczne wyniki badań [26, 35, 60] Również formulacja antracyklin jest istotna. Liposomalne formy podania doksorubicyny wykazywały podobną skuteczność, co przy klasycznym podaniu, jednak działanie kardiotoksyczne było niższe. Niemniej użycie tej metody jest ograniczone przez wysokie koszty [40]. Trwają również badania nad statynami, których kardioprotekcyjne działanie wykazano wśród kobiet z rakiem piersi – przy ich zastosowaniu zmniejszone zostało ryzyko niewydolności serca podczas terapii antracyklinami [82].

MECHANIZMY KARDIOTOKSYCZNOŚCI

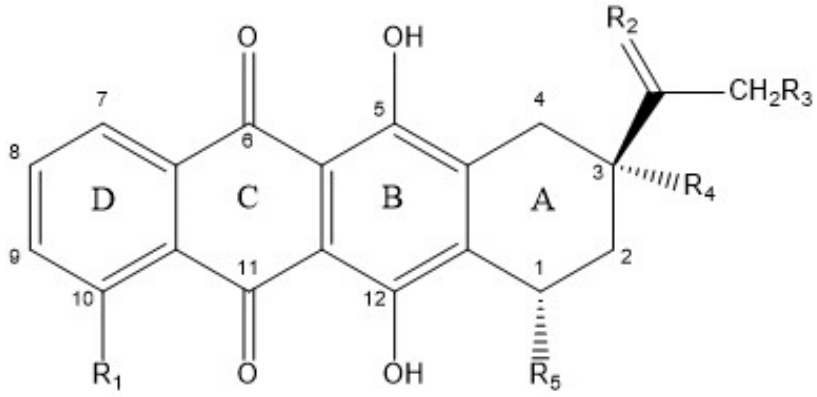
U podstaw kardiotoksycznego działania antracyklin leży najprawdopodobniej szereg mechanizmów, zachodzących w komórkach mięśnia sercowego w odpowiedzi na zastosowaną chemioterapię. Sugeruje się, że antracykliny wywołują efekt kardiotoksyczny głównie poprzez: nasilenie produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), tworzenie kompleksów z DNA oraz izoenzymem IIβ topoizomerazy (TopIIβ), a także wpływ na sygnalizację wewnątrzkomórkową poprzez receptory z rodziny ErbB/HER w kardiomiocytach [31, 41, 61].

Skutkiem nasilenia produkcji ROS, powstających głównie w wyniku przemian oksydacyjno-redukcyjnych ugrupowania chinonowego w cząsteczkach antracyklin oraz zdolności do tworzenia przez nie kompleksów z żelazem, jest peroksydacja lipidów, upośledzenie funkcji mitochondriów oraz bezpośrednie uszkodzenie błony komórkowej i struktury DNA. Prowadzi to ostatecznie do degradacji kardiomiocytów.

Kluczową rolę w kardiotoksycznym działaniu antracyklin odgrywa również ich zdolność do tworzenia trójskładnikowych kompleksów z topoizomerazami IIα/IIβ oraz DNA. W szybko dzielących się komórkach, a więc także w komórkach nowotworowych, ekspresji ulega głównie TopIIα. Antracykliny, po utworzeniu kompleksów z topoizomerazą, zyskują zdolność do interkalowania DNA, tym samym prowadząc do zaburzenia procesu replikacji i apoptotycznej śmierci komórek nowotworowych. W komórkach niedzielących się, takich jak kardiomiocyty, ekspresji ulega głównie TopIIβ, a tworzące się kompleksy indukują po-

wstawanie pęknięć podwójnej helisy DNA. Prowadzi to do zaburzenia pracy mitochondriów i apoptotycznej śmierci kardiomiocytów w wyniku aktywacji białka p53 [61, 78, 106].

Kardiotoksyczność antracyklin jest również wynikiem ich wpływu na przekaźnictwo sygnałowe za pośrednictwem receptorów z rodziny EGFR, dokładniej ErbB2 oraz ErbB4. Należą one do grupy receptorowych kinaz tyrozynowych, których ligandem jest neuregulina-1 (NRG-1). Badania dowodzą, że przekazywanie sygnałów w szlaku NRG-1/ErbB jest kluczowe dla zachowania odpowiedniej budowy mięśnia sercowego u osób dorosłych [34, 98] z kolei terapia antracyklinami prowadzi do zwiększenia wrażliwości kardiomiocytów na zmiany w sygnalizacji NRG-1/ErbB [38]. Postulowany mechanizm działania antracyklin, opracowany na podstawie badań na modelach zwierzęcych, opiera się w tym przypadku na zmniejszeniu ilości receptorów ErbB4 przy jednoczesnym braku wpływu na ekspresję receptorów ErbB2 w kardiomiocytach, po zastosowaniu u pacjentów intensywnej, krótkotrwałej terapii antracyklinami. Natomiast w przypadku terapii długotrwałej zaobserwowano wzrost ekspresji receptorów ErbB2 [38, 61]. Istotną rolę w łagodzeniu kardiotoksycznego działania antracyklin może pełnić sama NRG-1, której zwiększony poziom działa hamująco na indukowane przez antracykliny uszkodzenie miofibryli oraz zapobiega degradacji troponiny, co zostało udowodnione w badaniach *in vitro* [98].



RYCINA 1. Schemat budowy antracyklin. R1 to proton, grupa hydroksylowa lub metoksylowa. R2 stanowi grupę karbonylową, jednak jest to również dogodne miejsce cząsteczki do tworzenia konigatów z innymi cząsteczkami (np. walrubicyna). R3 łańcuch boczny zakończony jest protonem lub grupą hydroksylową. R4 stanowi grupa hydroksylowa i w jednym przypadku – amrubicynie – grupa aminowa. R5 to różnie zmodyfikowany aminosacharyd

FIGURE 1. Structure of anthracyclines. R1 is a proton, hydroxy or methoxy group. R2 is carbonyl moiety, however it is also suitable to design conjugates with other molecules. R3 – side chain is substituted with proton or hydroxy moiety. R5 is variety modified aminosaccharide

STRUKTURA ANTYBIOTYKÓW ANTRACYKLINOWYCH

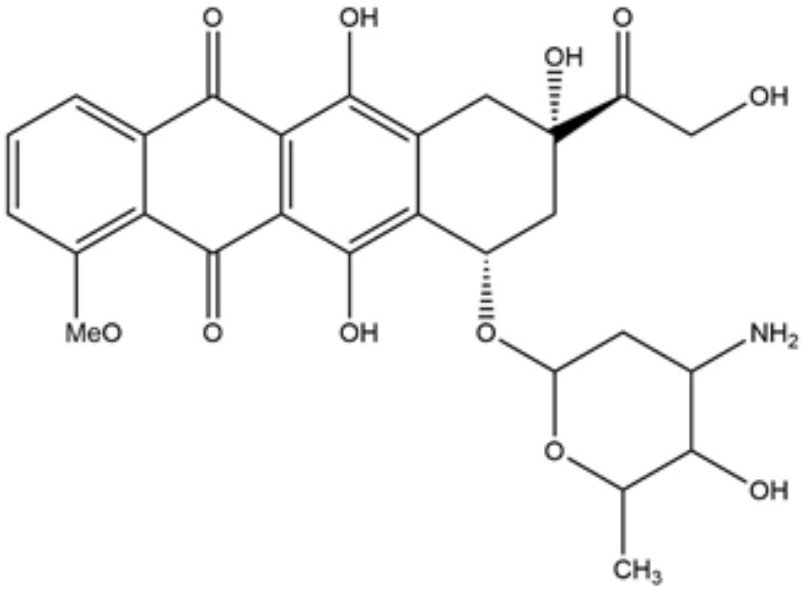
Antybiotyki antracyklinowe są pochodnymi antrachinonu. W pozycji 1 szkieletu węglowego znajduje się grupa cukrowa, połączona z nasyconym pierścieniem A wiązaniem α-glikozydowym. Grupa ta nadaje związkowi charakter zasadowy i decyduje o jego farmakokinetyce (**Ryc. 1**).

PRZEGLĄD ANTYBIOTYKÓW ANTRACYKLINOWYCH

Doksorubicyna

Doksorubicyna jest jednym z głównych przedstawicieli antybiotyków antracyklinowych. W strukturze jej pierścienia w pozycji 3. przyłączone zostało ugrupowanie hydroksymetylokarbonylowe, zaś w pozycji 10. znajduje się grupa metoksylowa (**Ryc. 2**).

Doksorubicyna wykorzystywana jest w terapii nowotworów żołądka, tarczycy, płuc, mięsaków tkanek miękkich oraz kości, chłoniaków, w tym chłoniaka Hodgkina oraz szpiczaków (**Tab. 1**). Ponadto znalazła zastosowanie w leczeniu nowotworów endometrium, jajnika oraz jako lek pierwszego rzutu w leczeniu raka piersi [76].



RYCINA 2. Doksorubicyna
FIGURE 2. Doxorubicin

TABELA 1. Przykładowe schematy chemioterapii zawierające doksorubicynę. Schematy AC stosowane są w terapii HER-ujemnego raka piersi, a ABVD i BEACOPP w leczeniu chłoniaka Hodkina. BLEO – bleomycyna, CTX – cyklofosfamid, DTIC – dekarbazyna, DXL – docetaksel, ETOP – etopozyd, G-SCF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów, PCZ – prokarbazyna, PDN – prednizon, PXL – paklitaksel, VBL – winblastyna, VCR – winkrystyna [Na podstawie wytycznych Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej]

TABLE 1. Example chemotherapy regimens containing doxorubicin. AC regimens are used in the therapy of HER-negative breast cancer, while ABVD and BEACOPP in the treatment of Hodkin lymphoma. BLEO – bleomycin, CTX – cyclophosphamide, DTIC – dacarbazine, DXL – docetaxel, ETOP – etoposide, G-SCF Granulocyte colony-stimulating factor, PCZ – procarbazine, PDN – prednisone, PXL – paclitaxel, VBL – vinblastine, VCR – vincristine [based on indications of Polish Society of Clinical Oncology]

Schemat	DOX w terapii skojarzonej z:
AC	CTX
AC-P*	CTX, PXL
AC-T*	CTX, DXL
ABVD	VBL, DTIC, BLEO
BEACOPP	BLEO, ETOP, VCR PDN, PCZ, G-CSF

Okres półtrwania doksorubicyny w fazie eliminacji wynosi około 30 godzin. Lek wiąże się z białkami na poziomie 50-85%. Nie przekracza również bariery krew-mózg, co czyni go nieskutecznym w terapii nowotworów ośrodkowego układu nerwowego. Doksorubicyna wydalana jest głównie z żółcią, w mniejszym stopniu eliminowana jest z moczem [89].

Efekt kardiotoksyczny doksorubicyny ujawnia się po około 2-3 dniach od przyjęcia wysokiej dawki leku. Może się ujawniać jako typ ostry lub przewlekły. W przeciwieństwie do typu ostrego, typ przewlekły kardiotoksyczności jest niemożliwy do wyleczenia. W badaniach udowodniono, że dawki doksorubicyny powyżej 400 mg/m2 są skorelowane z 5 % zwiększeniem prawdopodobieństwa wystąpienia niewydolności serca [83]. Doksorubicyna metabolizowana jest głównie za pomocą NADPH-zależnych cytoplazmatycznych enzymów aldo-keto –reduktaz i reduktaz karbonylowych obecnych w komórkach, w szczególności w komórkach nerek, wątroby oraz krwinkach czerwonych. Powstający metabolit doksorubicynol również jest kardiotoksyczny. NADPH-zależna reduktaza cytochromowa pośredniczy w tworzeniu nierozpuszczalnych w wodzie aglikonów – doksorubicynonu oraz 7-deoksydoksorubicynonu [89].

Daunorubicyna

Daunorubicyna to jedna z najwcześniej wyizolowanych antracyklin pochodząca z bakterii *Streptomyces peucetius.* Jest strukturalnym analogiem doksoru-

bicyny w którym w łańcuchu bocznym – grupa alkoholowa doksorubicyny zastąpiona jest atomem wodoru.

Substancja znajduje zastosowanie w ostrych białaczkach nielimfocytowych, w tym w ostrych białaczkach szpikowych, promielocytowych i erytrocytarnych u dorosłych i ostrej białaczce limfocytowej zarówno u dzieci, jak i u dorosłych [100]. Stosowana jest w połączeniu z innymi lekami cytotoksycznymi – cytarabiną oraz połączeniem winkrystyny i prednizolonu. Jest metabolizowana w wątrobie. 25% dawki jest wydalane w postaci aktywnej z moczem, a około 40% z żółcią [6].

Daunorubicyna może powodować zastoinową niewydolnością serca, zapaleniem mięśnia sercowego lub zapaleniem osierdzia. U dorosłych zwykle. działanie kardiotoksyczne występuje po kumulacyjnej dawce przekraczającej 400- 550 mg/m2, chociaż może również wystąpić przy dawkach, tak niskich jak 200 mg/m2. Metaanaliza przeprowadzona w 2016 roku wskazuje, że u młodych pacjentów chorujących na ostrą białaczkę szpikową wyższe dawki daunorubicyny mogą zwiększyć wskaźnik całkowitej remisji i poprawić długoterminowe wyniki. Zwraca jednak uwagę na potrzebę prowadzenia dalszych badań w celu określenia grupy osób mogących osiągać korzyści z takiej terapii [90].

Idarubicyna

Idarubicyna jest syntetycznym analogiem daunorubicyny, w której nie występuje grupa metoksylowa w pozycji 4 [33]. Może być podawana w postaci wlewów dożylnych, lub stosowana doustnie, co wyróżnia ją na tle innych leków tej grupy chemicznej [13]. Kapsułki Zavedos jako postać doustna zostały wprowadzone do lecznictwa dawkach 5, 10 i 25mg. Po podaniu doustnym idarubicyna jest szybko wchłaniana i możliwa do wykrycia w osoczu w ciągu 30 minut. Maksymalne stężenie osiągane jest po 1-9 godzinach. W porównaniu do daunorubicyny, cechuje ją wyższa lipofilowość i lepsza absorbcja przez błonę śluzową przewodu pokarmowego oraz do komórek guza [13]. Posiada też wyższą aktywność i biodostępność od daunorubicyny, jednocześnie wykazując słabsze działanie kardiotoksyczne [33]. Stosowana jest głównie w leczeniu ostrej białaczki szpikowej [2], często w kombinacji z cytarabiną. Wykazuje też aktywność w leczeniu innych rodzajów ostrych białaczek, zaawansowanego raka piersi, szpiczaka mnogiego i chłoniaków nieziarniczych [43]. Mechanizm działania idarubicyny jest analogiczny przedstawionych wyżej antracyklin [33].

Idarubicyna posiada wysoką objętość dystrybucji (1214 do 1889 L/m2). Po podaniu doustnym ulega efektowi pierwszego przejścia w wątrobie, metabolizując do idarubicynolu poprzez redukcję grupy ketonowej przy C13. Metabolit wykazuje podobną aktywność do idarubicyny zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Przypuszcza się, że wyższa skuteczność kliniczna idarubicyny podawanej doustnie w porównaniu do postaci dożylnej w zaawansowanym raku piersi jest związana z większą ekspozycją organizmu na idarubicynol. Okres półtrwania ida-

rubicyny po podaniu doustnym wynosi od 5 do 24 godzin, dla idarubicynolu od 13 do 60 godzin. Oba związki w dużym stopniu wiążą się z białkami. Wydalane są głównie z żółcią [13].

Epirubicyna

Epirubicyna jest epimerem doksorubicyny; różnica w strukturze dotyczy położenia przestrzennego grupy hydroksylowej w pozycji 4' aminosacharydu. Okres półtrwania związku wynosi około 32h. Jego klirens osoczowy jest od 50-100% wyższy niż ten w przypadku doksorubicyny Ponadto epirubicyna jest związkiem o wyższej lipofilowości. Po podaniu dożylnym około 20% dawki wydalane jest z moczem w postaci niezmienionej lub sprzężonej z kwasem glukuronowym. Główną drogą jej eliminacji jest eliminacja z żółcią – po 3 dniach od podania wydalane jest około 40% dawki. 50% dawki epirubicyny eliminowane jest w ciągu 4 dni, a w przypadku doksorubicyny okres ten wynosi 7 dni [77].

Lek wykazuje korzystniejszy profil bezpieczeństwa i w znacząco wyższych dawkach wywołuje kardiotoksyczność w stosunku do doksorubicyny [48].

Epirubicyna metabolizowana jest głównie za pomocą UGT2B7 do glukuronowych pochodnych, które są nietoksyczne i łatwo wydalane [25]. Ta ścieżka metabolizmu jest na ogół niespotykana u antracyklin i postuluje się, że stanowi ona o mniejszej kardiotoksyczności tego leku [55]. Innymi produktami przemian epirubicyny są aglikony oraz epirubicynol. Tak samo, jak w przypadku innych antracyklin, epirubicynol powstaje w wyniku redukcji ugrupowania ketonowego przy udziale cytozolowych reduktaz. Stężenie epirubicynolu w porównaniu ze związkiem macierzystym jest niższe, niższa jest również jego aktywność cytotoksyczna [77].

Epirubicyna znalazła zastosowanie w leczeniu raka przełyku, przewodu pokarmowego, płuc oraz nowotworów związanych z układem rozrodczym, takich jak nowotwory prostaty, endometrium czy jajnika. Lek wykorzystywany jest także w terapii nowotworu piersi [27].

Amrubicyna

Amrubicyna, (SM-5887), to całkowicie syntetyczna antracyklina, w strukturze której w pozycji 9 zamiast grupy hydorksylowej, występuje grupa aminowa, co poskutkowało zmianą aktywności. W aktywności przeciwnowotworowej dużą rolę przypisuje się aktywnemu metabolitowi – amrubicynolowi, który wykazuje silniejszy efekt hamujący wzrost komórek nowotworowych niż związek macierzysty. W zależności od badań, podaje się, że w warunkach *in vitro* amrubicynol może działać od 5 do 54 razy [103], a nawet 200 razy silniej niż amrubicyna [54]. Jest to cecha wyróżniająca amrubicynę na tle innych antracyklin, które posiadają mniej aktywne metabolity. Najczęstszym działaniem niepożądanym wywoływanym przez amrubicynol jest toksyczność hematologiczna. Kardiotoksyczność jest rzadziej obserwowana [50].

Działanie hamujące wzrost komórek związane jest głównie z inhibicją topoizomerazy II, z którą tworzy stabilniejszy kompleks lek-DNA-enzym niż doksorubicyna. Jednocześnie, SM-5887 posiada mniejszą zdolność interkalacji DNA, co może przyczyniać się do zaledwie 20% dystrybucji leku i jego metabolitu do jąder komórek linii P388. W porównaniu do doksorubicyny, dystrubucja wynosiła 80% [29].

Amrubicyna wykazuje wysoki klirens osoczowy i dużo mniejszą objętość dystrybucji niż doksorubicyna. Jest to prawdopodobnie wynikiem słabego wiązania się z tkankami i może być przyczyną mniejszej kardiotoksyczności stwierdzonej w badaniach przedklinicznych. Podczas badań zaobserwowano także wypadanie włosów w mniejszym stopniu i łagodniejsze uszkodzenia tkanek. SM-5887 wydalana jest w 78% z kałem, wydalanie z moczem jest minimalne [46].

Amrubicyna jest obecnie zarejestrowana tylko w Japonii i stosuje się ją w terapii drobnokomórkowego i niedrobnokomórkowego raka płuc[70].

Walrubicyna

Walrubicyna (AD-32) różni się od doksorubicyny N-trifluoroacetylacją i dodatkiem 14-walerianianowej pochodnej do pierścienia A. Zaliczana jest to antracyklin II generacji [39]. Została wprowadzona do leczenia w 1999 roku i wchodzi w skład leku Valstar, który jest podawany dopęcherzowo. Jego wskazaniem rejestracyjnym jest rak pęcherza moczowego oporny na terapię bakteriami *Bacillus Calmette-Guerin* [1]. Walrubicyna ma około 24-krotnie większą lipofilowość od doksorubicyny. AD- 32 jest metabolizowana głównie do dwóch metabolitów: N-trifluoroacetyladriamycyny i N- trifluoroacetyladriamycinolu poprzez usunięcie grupy walerianianowej [68]. Walrubicyna cechuje się brakiem toksyczności kontaktowej i kardiotoksyczności. [85]. Ze względu na wysoką hydrofobowość, AD-32 jest obiecującym kandydatem do wykorzystania jako środek chemioterapeutyczny w połączeniu z nanocząsteczkami rHDL jako nośnikami dostarczającymi. Mogłoby to zmniejszyć toksyczność i zwiększyć stabilność kompleksu w porównaniu do wolnej frakcji walrubicyny [84].

Aklarubicyna

Aklarubicyna reprezentuje grupę antracyklin zwaną aklacynomycynami, stąd znana jest również pod nazwą aklacynomycyna A. Aglikon aklarubicyny stanowi układ aklawinonu, natomiast część cukrowa posiada charakterystyczną budowę, która odróżnia ten związek od pozostałych antracyklin. Łańcuch glikonowy składa się bowiem z trzech reszt cukrowych: L-rodozaminy, 2-deoksyfukozy oraz cinerulozy A [63, 74]. Aklarubicyna różni się od antracyklin I generacji, takich jak doksorubicyna, również odmiennym stopniem metylacji aminocukru, co wpływa na ładunek cząsteczki i jej lipofilowość. Substancja ta wykazuje także częściowo odmienny mechanizm działania, będąc zarówno inhibitorem topoizomerazy II, jak i topoizomerazy I. Ponadto badania wykazały, że aklarubicyna nie wywołuje

pęknięć podwójnej helisy DNA oraz indukuje produkcję ROS w znacznie mniejszym stopniu niż doksorubicyna i daunorubicyna, ze względu na brak zdolności do tworzenia kompleksów z żelazem [23, 51].

W porównaniu z antracyklinami I generacji, aklarubicyna wywołuje nieznacznie łagodniejsze działania niepożądane, w tym słabszą kardiotoksyczność, a także charakteryzuje się mniejszą zdolnością do wywołania lekooporności, jednakże jej możliwości zastosowania nie są tak szerokie, jak w przypadku DOX czy DNR [23, 63]. W badaniach klinicznych aklarubicyna stosowana była przede wszystkim w terapii ostrych białaczek limfatycznych i szpikowych oraz w zespołach mielodysplastycznych, w połączeniu z cytarabiną i G-CSF (tzw. terapia CAG). Udowodniono wysoką skuteczność i bezpieczeństwo tej terapii, w porównaniu do alternatywnych metod leczenia [101], jednakże aktualne wytyczne nie uwzględniają aklarubicyny w standardowych schematach terapii [28, 42]. Wykazano również wyższą skuteczność terapii CAG w połączeniu z decytabiną, w porównaniu z CAG [58, 105]. Postulowano również możliwość zastosowania aklarubicyny jako leku drugiego rzutu w terapii raka jajnika, a także w leczeniu chłoniaka Hodgkina, jednak dowody na skuteczność aklarubicyny w tych wskazaniach są niewystarczające [11, 80].

Annamycyna

Annamycyna jest silnie lipofilowym analogiem doksorubicyny należącej do grupy antracyklin. Modyfikacja struktury polega na wbudowaniu atomu jodu do części cukrowej [102].

Annamycyna w porównaniu do doksorubicyny osiąga stosunkowo wysoki poziom akumulacji komórkowej, szczególnie w liniach komórkowych opornych na wiele leków i wywołuje u nich znaczące uszkodzenia DNA. Wskazuje się na jej wysoki potencjał w leczeniu nawrotowej/opornej ostrej białaczki limfoblastycznej. Znacznie zwiększone stężenie annamycyny w płucach, w porównaniu do doksorubicyny, prowadzi do wysokiej skuteczności leku *in vivo* w modelach guzów zlokalizowanych w płucach [108]. Nie stwierdza się kardiotoksyczności nawet przy dawkach 2200 mg/m2 [86].

Karminomycyna

Karminomycyna, czyli 4-demetylodaunorubicyna należy do antracyklin naturalnych. Jest produkowana przez bakterie *Actinomadura carminata*. Wykazuje znacznie silniejsze działanie niż daunorubicyna czy doksorubicyna. Jest skuteczna w leczeniu raka piersi z przerzutami, mięsaków tkanek miękkich, ostrych białaczek limfoblastycznych lub mieloblastycznych. Wykazano, że stopień kardiotoksyczności, toksyczności żołądkowo-jelitowej, a także łysienia karminomycyny jest mniejszy niż w przypadku doksorubicyny [21].

Pirarubicyna

Pirarubicyna (THP) jest tetrahydropiranylową pochodną powstałą po 4'- glikozydacji doksorubicyny. Została wynaleziona i opisana przez japońskich naukowców w 1979 roku [97]. Dzięki zwiększonej hydrofobowości substancja ta jest ponad 10-krotnie szybciej wychwytywana przez komórki niż doksorubicyna, co potwierdzono w badaniach *in vitro* na liniach mysich komórek nowotworowych np. białaczki limfocytowej. Dzięki temu, cechuje się 7-10 razy wyższą cytotoksycznością [52, 53]. W badaniach *in vivo* na chomikach [62,96] oraz w badaniu klinicznym – podczas terapii ostrej białaczki limfoblastycznej wieku dziecięcego [44], wykazano niższą kardiotoksyczność niż dla doksorubicyny i daunorubicyny. Jednak pomimo wyższej skuteczności terapeutycznej i niższej kardiotoksyczności, pirarubicyna powoduje poważne efekty niepożądane, m.in. mielosupresję, trombocytopenię i leukopenię [62], które limitują dawkę, bądź niejednokrotnie prowadzą do przerwania terapii [63].

Najnowsze doniesienia dotyczące pirarubicyny odnoszą się do badań *in vitro* nad aktywnością koniungatów kopolimeru pirarubicyny z N-(2-hydroksypropylo) metakryloamidem (HPMA) w sferoidach komórek raka okrężnicy. Wykazano, że kopolimer HPMA pirarubicyny, miał porównywalną cytotoksyczność do wolnej pirarubicyny wobec komórek nowotworowych w postaci sferoidalnej przy 7-krotnie niższej cytotoksyczności wobec komórek hodowanych w płaszczyźnie dwuwymiarowej. Jest to spowodowane 12-krotnie szybszym przenikaniem polimeru THP niż wolnej pirarubicyny przez warstwę komórek jednowarstwowych przy niższym wychwycie dokomórkowym tego polimeru [65].

Przeprowadzono również randomizowane badanie kliniczne zastosowaniem pirarubicyny w dopęcherzowej terapii u pacjentów z nieinwazyjnym rakiem pęcherza moczowego o średnim i niskim ryzyku [66]. W badanej grupie pacjentów podawano dodatkowe wkroplenie 30 mg pirarubicyny co tydzień przez 8 tygodni i porównano z grupą pacjentów, którym podano THP dopęcherzowo bezpośrednio pooperacyjnie. Badanie to dało obiecujące wyniki – wykazano, że dodatkowe podanie pirarubicyny istotnie statystycznie zmniejszyło ryzyko nawrotu guza bez powodowania ciężkich działań niepożądanych. Ponadto, przeprowadzono kontrolowane nierandomizowane badanie kliniczne, w którym potwierdzono skuteczność pirarubicyny w nowym schemacie termochemioterapii nieinwazyjnego raka pęcherza moczowego o średnim i wysokim stopniu ryzyka [107].

Sabarubicyna

Sabarubicyna (MEN 10755) stanowi disacharydową pochodną doksorubicyny, która została pozbawiona grupy metoksylowej przy czwartym węglu w aglikonie. Obecnie związek ten znajduje się w II fazie badań klinicznych [59]. Pojedyncze badania kliniczne wskazały na jej skuteczność w leczeniu raka drobnokomór-

kowego płuc [9], jajników [14] oraz postępującym i opornym na hormony raku prostaty [32]. W porównaniu z doksorubicyną i epirubicyną sabarubicyna wykazuje dwukrotnie krótszy końcowy okres półtrwania, znacznie mniejszy całkowity klirens osoczowy oraz znacznie mniejszą objętość dystrybucji [12]. Brak grupy metoksylowej przy czwartym atomie węgla, jak i disacharydowa budowa sprawiają, że związek w mniejszym stopniu zostaje przekształcony do toksycznego, alkoholowego metabolitu [64]. Sabarubicyna w porównaniu z doksorubicyną silniej tworzy stabilniejsze kompleksy z topoizomerazą II, a ponadto w odróżnieniu od DOX prowadzi do fosforylacji przeciwapoptotycznego białka Bcl-2, co warunkuje jej silniejsze właściwości przeciwnowotworowe [3, 72]. Antracyklina wykazuje mniejszą kardiotoksyczność, a także efektywniejsze działanie przeciwnowotworowe *in vivo* w porównaniu z doksorubicyną [19, 72].

Zorubicyna

Zorubicyna stanowi półsyntetyczny analog doksorubicyny o obniżonej kardiotoksyczności[88]. W przemyśle farmaceutycznym występuje w preparacie jednoskładnikowym Rubidazone®, stosowanym w ostrej białaczce limfoblastycznej i mieloblastycznej u dorosłych, jak i u dzieci [47, 75]. Cechą odróżniającą zorubicynę od pozostałych antracyklin jest jej zmniejszona stabilność w temperaturze pokojowej, przez co niezbędne jest natychmiastowe podanie wlewu po przygotowaniu [104]. Niestety, pomimo obniżonej kardiotoksyczności w porównaniu z innymi antracyklinami, wciąż stanowi ona jeden z najistotniejszych efektów niepożądanych [75].

Antracenodiony

Grupą rodzimą do antracyklin są antracenodiony. Interesującymi przedstawicielami tej grupy są piksantron (aza-antracenedion) oraz mitoksantron Związki te różnią się mechanizmem działania. Oba stanowią inhibitory topoizomerazy IIα, jednak głównym mechanizmem działania piksantronu jest interkalacja z DNA [30, 79]. Piksantron został warunkowo zatwierdzony w monoterapii wielokrotnie nawracającego lub opornego, agresywnego NHL (ang. *non- Hodgkin's lymphoma*) komórek B [71], zaś mitoksantron w terapii różnych typów nowotworów, w tym raka prostaty, piersi, NHL, czy ostrej białaczki szpikowej [30, 87]. Dodatkowo piksantron nie posiada miejsca wiązania z żelazem, co uniemożliwia tworzenie toksycznych kompleksów lek-metal, za czym idzie ograniczone uwalnianie RFT i zmniejszenie kardiotoksyczności związku [7, 95]. Mitoksantron z kolei wyróżniają silne właściwości immunosupresyjne, powoduje śmierć i lizę limfocytów T i B, obniżenie zdolności migracyjnej monocytów oraz redukcję cytokin prozapalnych (INF-y, TNF-alfa i IL-2) [22].

PODSUMOWANIE

Pomimo prężnie rozwijających się innych form leczenia chorób nowotworowych, antracykliny nadal odgrywają ważną rolę w terapii onkologicznej. Ogólny mechanizm działania tej grupy leków został już całkiem dobrze poznany, chociaż dla każdego przedstawiciela główny czynnik cytotoksyczny może być trochę inny. O ile antracykliny mają potwierdzoną skuteczność w hamowaniu rozwoju komórek nowotworowych, to od lat czynnikiem limitującym ich stosowanie jest kardiotoksyczność. Poszukuje się różnych pochodnych, które cechowałyby się mniejszymi działaniami niepożądanymi, lepszą skutecznością, jak i optymalną farmakokinetyką. Daunorubicyna, jeden z pierwszych przedstawicieli, ma ograniczone zastosowanie ze względu na silne działanie kardiotoksyczne. Szersze wykorzystanie kliniczne znajdują doksorubicyna i jej analogi – idarubicyna czy epirubicyna, o wyższym profilu bezpieczeństwa. Trwają badania nad takimi antracyklinami jak aklarubicyna, annamcyna czy sabarubicyna, które charakteryzują się zwiększonym wpływem przeciwnowotworowym przy zmniejszonej toksyczności. Amrubicyna to interesująca antracyklina ze względu na bardzo silną cytotoksyczność jej aktywnego metabolitu – amrubicynolu. Należy przyznać, że zostały dokonane znaczące postępy w udoskonalaniu profilu aktywności i bezpieczeństwa tej grupy leków, niemniej wciąż dla pełnego sukcesu kluczowe jest znaczne ograniczenie ich kardiotoksyczności i zwiększenie skuteczności, szczególnie wobec opornych komórek nowotoworych.

PODZIĘKOWANIA

Finansowanie: praca została sfinansowana z projektu nr 2017/25/N/NZ7/01382 ufundowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

LITERATURA

[1] First Generic Drug Approvals | FDA https://www.fda.gov/drugs/first-generic-drug-approvals/2019-first-generic-drug-approvals (dostęp: 29.09.2021)

[2] ADIGE S, LAPIDUS RG, CARTER-COOPER BA, DUFFY A, PATZKE C, LAW JY, BAER MR, AMBULOS NP, ZOU Y, BENTZEN SM, EMADI A. Equipotent doses of daunorubicin and idarubicin for AML: a meta-analysis of clinical trials versus in vitro estimation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2019; **83:** 1105–1112.

[3] ARCAMONE F, ANIMATI F, BERETTONI M, BIGIONI M, CAPRANICO G, CASAZZA AM, CASERINI C, CIPOLLONE A, DE CESARE M, FRANCIOTTI M, LOMBARDI P, MADAMI A,

MANZINI S, MONTEAGUDO E, POLIZZI D, I WSP. Doxorubicin disaccharide analogue: Apoptosis-related improvement of efficacy in vivo. *J Natl Cancer Inst* 1997; **89:** 1217–1223.

[4] ARMENIAN S, BHATIA S. Predicting and Preventing Anthracycline-Related Cardiotoxicity. *Am Soc Clin Oncol Educ B* 2018; 3–12.

[5] AVILA MS, AYUB-FERREIRA SM, DE BARROS WANDERLEY MR, DAS DORES CRUZ F, GONÇALVES BRANDÃO SM, RIGAUD VOC, HIGUCHI-DOS-SANTOS MH, HAJJAR LA, KALIL FILHO R, HOFF PM, SAHADE M, FERRARI MSM, DE PAULA COSTA RL, MANO MS, BITTENCOURT VIANA CRUZ CB, I WSP. Carvedilol for Prevention of Chemotherapy-Related Cardiotoxicity. *J Am Coll Cardiol* 2018; **71:** 2281–2290.

[6] BACHUR N.R. Anthracycline antibiotic pharmacology and metabolism. *Cancer Treat Rep* 1979; **63:** 817–820.

[7] BEEHARRY N, DI RORA AGL, SMITH MR, YEN TJ. Pixantrone induces cell death through mitotic perturbations and subsequent aberrant cell divisions. *Cancer Biol Ther* 2015; **16:** 1397–1406.

[8] BHATIA S. Genetics of Anthracycline Cardiomyopathy in Cancer Survivors: JACC: CardioOncology State-of-the-Art Review. *JACC CardioOncology* 2020; **2:** 539–552.

[9] BIGIONI M, BENZO A, IRRISSUTO C, LOPEZ G, CURATELLA B, MAGGI CA, MANZINI S, CREA A, CAROLI S, CUBADDA F, BINASCHI M. Antitumour effect of combination treatment with Sabarubicin (MEN 10755) and cis-platin (DDP) in human lung tumour xenograft. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008; **62:** 621–629.

[10] BINASCHI M, CAPRANICO G, DAL BO L, ZUNINO F. Relationship between lethal effects and topoisomerase II-mediated double-stranded DNA breaks produced by anthracyclines with different sequence specificity. *Mol Pharmacol* 1997; **51:** 1053–1059.

[11] DU BOIS A, LÜCK HJ, PFISTERER J, MEIER W, BAUKNECHT T. [Anthracyclines in therapy of ovarian carcinoma: a systematic review of primary and 2nd-line therapy after platinum]. *Zentralbl Gynakol* 2000; **122(5):** 255–267.

[12] BOS AME, DE VRIES EGE, DOMBERNOVSKY P, AAMDAL S, UGES DRA, SCHRIJVERS D, WANDERS J, ROELVINK MWJ, HANAUSKE AR, BORTINI S, CAPRIATI A, CREA AEG, VERMORKEN JB Pharmacokinetics of MEN-10755, a novel anthracycline disaccharide analogue, in two phase I studies in adults with advanced solid tumours. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; **48:** 361–369.

[13] BUCKLEY MM, LAMB HM. Oral idarubicin. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in the treatment of haematological malignancies and advanced breast cancer. *Drugs and Aging* 1997; **11:** 61–86.

[14] CAPONIGRO F, WILLEMSE P, SORIO R, FLOQUET A, VAN BELLE S, DEMOL J, TAMBARO R, COMANDINI A, CAPRIATI A, ADANK S, WANDERS J. A phase II study of sabarubicin (MEN-10755) as second line therapy in patients with locally advanced or metastatic platinum/taxane resistant ovarian cancer. *Invest New Drugs* 2005; **23:** 85–89.

[15] CARDINALE D, SANDRI MT, MARTINONI A, BORGHINI E, CIVELLI M, LAMANTIA G, CINIERI S, MARTINELLI G, FIORENTINI C, CIPOLLA CM. Myocardial injury revealed by plasma troponin I in breast cancer treated with high-dose chemotherapy. *Ann Oncol* 2002; **13:** 710–715.

[16] CARDINALE D, COLOMBO A, BACCHIANI G, TEDESCHI I, MERONI CA, VEGLIA F, CIVELLI M, LAMANTIA G, COLOMBO N, CURIGLIANO G, FIORENTINI C, CIPOLLA CM. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation* 2015; **131:** 1981–1988.

[17] CHAIRES JB, HERRERA JE, WARING MJ. Preferential Binding of Daunomycin to 5′TACG and 5′TAGC Sequences Revealed by Footprinting Titration Experiments. *Biochemistry* 1990; **29:** 6145–6153.

[18] CHANG W, FENG Y, KUO YH, CHEN W, WU H, HUANG C, WANG W, LIAO C, CHEN Z. The impact of a multidisciplinary cardio-oncology programme on cardiovascular outcomes in Taiwan. *ESC Hear Fail* 2020; **7:** 2135–2139.

[19] CIRILLO R, SACCO G, VENTURELLA S, BRIGHTWELL J, GIACHETTI A, MANZINI S. Comparison of doxorubicin- and MEN 10755-induced long-term progressive cardiotoxicity in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; **35:** 100–108.

[20] DAL BEN D, PALUMBO M, ZAGOTTO G, CAPRANICO G, MORO S. DNA Topoisomerase II Structures and Anthracycline Activity: Insights into Ternary Complex Formation. *Curr Pharm Des* 2007; **13:** 2766–2780.

[21] DANTCHEV D, ANJO A, BOURUT C, REYNES M, MATHE G. Comparative experimental and evaluation of cardiotoxicity and skin toxicity of twelve anthracycline analogs and one anthracendione. *Gann monograph on cancer research* 1989; **36:**109-115.

[22] DARGAHI N, KATSARA M, TSELIOS T, ANDROUTSOU ME, DE COURTEN M, MATSOUKAS J, APOSTOLOPOULOS V. Multiple sclerosis: Immunopathology and treatment update. *Brain Sci* 2017; **7(7):** 78.

[23] DARTSCH DC, SCHAEFER A, BOLDT S, KOLCH W, MARQUARDT H. Comparison of anthracycline-induced death of human leukemia cells: Programmed cell death versus necrosis. *Apoptosis* 2002; **7:** 537–548.

[24] DAVIES A, KELVIN J, DOROSHOW OT JH. Redox Cycling of Anthracyclines by Cardiac Mitochondria. *J Biol Chem* 1986; **261:** 3060–3067.

[25] DELLINGER RW, MATUNDAN HH, AHMED AS, DUONG PH, MEYSKENS FL. Anti-Cancer Drugs Elicit Re-Expression of UDP-Glucuronosyltransferases in Melanoma Cells. *PLoS One* 2012; **7:** e47696;

[26] DENG S, YAN T, JENDRNY C, NEMECEK A, VINCETIC M, GÖDTEL-ARMBRUST U, WOJNOWSKI L. Dexrazoxane may prevent doxorubicin-induced DNA damage via depleting both Topoisomerase II isoforms. *BMC Cancer* 2014; **14:** 1–11.

[27] EDWARDSON D, NARENDRULA R, CHEWCHUK S, MISPEL-BEYER K, MAPLETOFT J, PARISSENTI A. Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Curr Drug Metab* 2015; **16:** 412–426.

[28] EICHHORST B, ROBAK T, MONTSERRAT E, GHIA P, NIEMANN CU, KATER AP, GREGOR M, CYMBALISTA F, BUSKE C, HILLMEN P, HALLEK M, MEY U. Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2021; **32:** 23–33.

[29] ETTINGER DS. Amrubicin for the treatment of small cell lung cancer: Does effectiveness cross the Pacific? *J Thorac Oncol* 2007; **2:** 160–165.

[30] EVISON BJ, SLEEBS BE, WATSON KG, PHILLIPS DR, CUTTS SM. Mitoxantrone, More than Just Another Topoisomerase II Poison. *Med Res Rev,* 2016; **36:** 248–299.

[31] EWER MS, EWER SM. Cardiotoxicity of anticancer treatments. *Nat Rev Cardiol* 2015; **12:** 547–558.

[32] FIEDLER W, TCHEN N, BLOCH J, FARGEOT P, SORIO R, VERMORKEN JB, COLLETTE L, LACOMBE D, TWELVES C. A study from the EORTC new drug development group: Open label phase II study of sabarubicin (MEN-10755) in patients with progressive hormone refractory prostate cancer. *Eur J Cancer* 2006; **42:** 200–204.

[33] FIELDS SM, KOELLER JM. Idarubicin: A second-generation anthracycline. *DICP Ann Pharmacothe,* 1991; **25:** 505–517.

[34] FUKAZAWA R, MILLER TA, KURAMOCHI Y. FRANTZ S, KIM YD, MARCHIONNI MA, KELLY RA, SAWYER DB. Neuregulin-1 protects ventricular myocytes from anthracycline-induced apoptosis via erbB4-dependent activation of PI3-kinase/Akt. *J Mol Cell Cardiol* 2003; **35:** 1473–1479.

[35] GETZ KD, SUNG L, ALONZO TA, LEGER KJ, GERBING RB, POLLARD JA, COOPER T, KOLB EA, GAMIS AS, KY B, APLENC R. Effect of dexrazoxane on left ventricular systolic function and treatment outcomes in patients with acute myeloid leukemia: A report from the Children's oncology group. *J Clin Oncol* 2020; **38:** 2398–2406.

[36] GUANO F, POURQUIER P, TINELLI S, BINASCHI M, BIGIONI M, ANIMATI F, MANZINI S, ZUNINO F, KOHLHAGEN G, POMMIER Y, CAPRANICO G. Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines. *Mol Pharmacol* 1999; **56:** 77–84.

[37] GUPTA V, KUMAR SINGH S, AGRAWAL V, BALI SINGH T. Role of ACE inhibitors in anthracycline-induced cardiotoxicity: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatr Blood Cancer* 2018; **65(11):** e27308.

[38] HAHN VS, LENIHAN DJ, KY B. Cancer therapy-induced cardiotoxicity: Basic mechanisms and potential cardioprotective therapies. *J Am Heart Assoc*, 2014; **3(2):** e000665.

[39] HAJIAN R, HOSSAINI P, MEHRAYIN Z, WOI PM, SHAMS N. DNA-binding studies of valrubicin as a chemotherapy drug using spectroscopy and electrochemical techniques. *J Pharm Anal* [Internet]. 2017;7(3):176–80.

[40] HARRIS L, BATIST G, BELT R, ROVIRA D, NAVARI R, AZARNIA N, WELLES L, WINER E, GARRETT T, BLAYNEY D, ELIAS L, MORTIMER J, NEEDLES B. WEBB T, ATIBA J, I WSP. Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2002; **94:** 25–36.

[41] HENRIKSEN PA. Anthracycline cardiotoxicity: An update on mechanisms, monitoring and prevention. *Heart* 2018; **104:** 971–977.

[42] HEUSER M, OFRAN Y, BOISSEL N, BRUNET MAURI S, CRADDOCK C, JANSSEN J, WIERZBOWSKA A, BUSKE C. Acute myeloid leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2020; **31:** 697–712.

[43] HOLLINGSHEAD LM, FAULDS D. Idarubicin: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in the Chemotherapy of Cancer. *Drugs* 1991; **42:** 690–719.

[44] HORI H, KUDOH T, NISHIMURA S, ODA M, YOSHIDA M, HARA J, TAWA A, USAMI I, TANIZAWA A, YUMURA-YAGI K, KATO K, KOBAYASHI R, KOMADA Y, MATSUO K, HORIBE K. Acute and late toxicities of pirarubicin in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: results from a clinical trial by the Japan Association of Childhood Leukemia Study. *Int J Clin Oncol* 2017; **22:** 387–396.

[45] ICHIKAWA Y, GHANEFAR M, BAYEVA M, WU R, KHECHADURI A, NAGA PRASAD SV, MUTHARASAN RK, JAIRAJ NAIK T, ARDEHALI H. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J Clin Invest* 2014; **124:** 617–630.

[46] INOUE K, OGAWA M, HORIKOSHI N, MUKAIYAMA T, ITOH Y, IMAJOH K, OZEKI H, NAGAMINE D, SHINAGAWA K. Phase I and pharmacokinetic study of SM-5887, a new anthracycline derivative. *Invest New Drugs* 1989; **7:** 213–218.

[47] JACQUILLAT C, WEIL M, GEMON-AUCLERC MF, IZRAEL V, BUSSEL A, BOIRON M, BERNARD J. Clinical study of rubidazone (22 050 R.P.), a new daunorubicin-derived compound, in 170 patients with acute leukemias and other malignancies. *Cancer* 1976; **37:** 653–659.

[48] KAKLAMANI VG, GRADISHAR WJ. Epirubicin versus doxorubicin: Which is the anthracycline of choice for the treatment of breast cancer? *Clin Breast Cancer* 2003; **4:** 26-33.

[49] KAYA MG, OZKAN M, GUNEBAKMAZ O, AKKAYA H, KAYA EG, AKPEK M, KALAY N, DIKILITAS M, YARLIOGLUES M, KARACA H, BERK V, ARDIC I, ERGIN A, LAM YY. Protective effects of nebivolol against anthracycline-induced cardiomyopathy: A randomized control study. *Int J Cardiol* 2013; **167:** 2306–2310.

[50] KIMURA T, KUDOH S, MITSUOKA S, YOSHIMURA N, TANAKA H, ASAI K, KYOH S, TOCHINO Y, UMEKAWA K, HIRATA K. Plasma concentration of amrubicinol in plateau phase in patients treated for 3 days with amrubicin is correlated with hematological toxicities. *Anticancer Drugs* 2009; **20:** 513–518.

[51] KOCEVA-CHYŁA A, JĘDRZEJCZAK M, SKIERSKI J, KANIA K, JÓŹWIAK Z. Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: Relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis* 2005; **10:** 1497–1514.

[52] KUNIMOTO S, MIURA K, ZHIXU C, MASUDA T, TAKEUCHI T, UMEZAWA H, UMEZAWA K. Cellular Uptake and Efflux and Cytostatic Activity of 4'-0-Tetrahydropyranyladriamycin in Adriamycin-Sensitive and Resistant Tumor Cell Lines. *J Antibiot (Tokyo)* 1984; **37:** 1697–1702.
[53] KUNIMOTO S, MIURA K, TAKAHASHI Y, TAKEUCHI T, UMEZAWA H. Rapid uptake by cultured tumor cells and intracellular behavior of 4'-o-tetrahydropyranyladriamycin. *J Antibiot (Tokyo)* 1983; **36**: 312–317.
[54] KURATA T. Amrubicin for the treatment of advanced lung cancer. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol* 2009; **5**: 171–180.
[55] LI H, HU B, GUO Z, JIANG X, SU X, ZHANG X. Correlation of UGT2B7 polymorphism with cardiotoxicity in breast cancer patients undergoing epirubicin/cyclophosphamide-docetaxel adjuvant chemotherapy. *Yonsei Med. J* 2019; **60**: 30–37.
[56] LIPSHULTZ SE, ALVAREZ JA, SCULLY RE. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart* 2007; **94**: 525–533.
[57] LIPSHULTZ SE, MILLER TL, SCULLY RE, LIPSITZ SR, RIFAI N, SILVERMAN LB, COLAN SD, NEUBERG DS, DAHLBERG SE, HENKEL JM, ASSELIN BL, ATHALE UH, CLAVELL LA, LAVERDIÈRE C, MICHON B, I WSP. Changes in cardiac biomarkers during doxorubicin treatment of pediatric patients with high-risk acute lymphoblastic leukemia: Associations with long-term echocardiographic outcomes. J. *Clin. Oncol* 2012; **30**: 1042–1049.
[58] LIU J, JIA JS, GONG LZ, LU SY, ZHU HH, HUANG XJ, JIANG H. Efficacy and safety of decitabine in combination with G-CSF, low-dose cytarabine and aclarubicin in MDS-EB and AML-MRC. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2018; **39**: 734–738.
[59] MAZZINI S, SCAGLIONI L, ANIMATI F, MONDELLI R. Interaction between double helix DNA fragments and the new antitumor agent sabarubicin, Men10755. *Bioorganic Med. Chem* 2010; **18**: 1497–1506.
[60] MCCORMACK K. The cardioprotective effect of dexrazoxane (Cardioxane) is consistent with sequestration of poly(ADP-ribose) by self-assembly and not depletion of topoisomerase 2B. *Ecancermedicalscience* 2018; **12**: 889.
[61] MCGOWAN JV, CHUNG R, MAULIK A, PIOTROWSKA I, WALKER JM, YELLON DM. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc. Drugs Ther* 2017; **31**: 63–75.
[62] MILLER AA, SALEWSKI E. Prospects for pirarubicin. *Med. Pediatr. Oncol* 1994; **22**: 261–268.
[63] MINOTTI G, MENNA P, SALVATORELLI E, CAIRO G, GIANNI L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologie developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev* 2004; **56**: 185–229.
[64] MINOTTI G, PARLANI M, SALVATORELLI E, MENNA P, CIPOLLONE A, ANIMATI F, MAGGI CA, MANZINI S. Impairment of myocardial contractility by anticancer anthracyclines: Role of secondary alcohol metabolites and evidence of reduced toxicity by a novel disaccharide analogue. *Br. J. Pharmacol* 2001; **134**: 1271–1278
[65] NAKAMURA H, KOZIOLOVÁ E, CHYTIL P, ETRYCH T, HARATAKE M, MAEDA H. Superior Penetration and Cytotoxicity of HPMA Copolymer Conjugates of Pirarubicin in Tumor Cell Spheroid. *Mol. Pharm* 2019; **16**: 3452–3459.
[66] NAYA Y, MIKAMI K, TAKAHA N, INOUE Y, FUJIHARA A, KANAZAWA M, NAKANISHI H, MIYASHITA H, UKIMURA O. Randomized study of intravesical pirarubicin chemotherapy with low and intermediate-risk nonmuscle-invasive bladder cancer in Japan: Comparison of a single immediate postoperative intravesical instillation with short-term adjuvant intravesical instillatio. *Med (United States)* 2018; **97**: e12740.
[67] NICOLAZZI MA, CARNICELLI A, FUORLO M, SCALDAFERRI A, MASETTI R, LANDOLFI R, FAVUZZI AMR. Anthracycline and trastuzumab-induced cardiotoxicity in breast cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci* 2018; **22**: 2175–2185.
[68] ONRUST SV, LAMB HM. Valrubicin. Drugs Aging. 1999 Jul;15(1):69-75; discussion 76

[69] PAI VB, NAHATA MC. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents. Incidence, treatment and prevention. *Drug Saf* 2000; **22,4**: 263-302.
[70] VON PAWEL J, JOTTE R, SPIGEL DR, O'BRIEN MER, SOCINSKI MA, MEZGER J, STEINS M, BOSQUÉE L, BUBIS J, NACKAERTS K, TRIGO JM, CLINGAN P, SCHÜTTE W, LORIGAN P, RECK M, I WSP. Randomized phase III trial of Amrubicin versus topotecan as second-line treatment for patients with small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol* 2014; **32**: 4012–4018.
[71] PETTENGELL R, COIFFIER B, EGOROV A, SINGER J, SIVCHEVA L. Long-Term Response and Remission with Pixantrone in Patients with Relapsed or Refractory Aggressive Non-Hodgkin Lymphoma: Post-Hoc Analysis of the Multicenter, Open-Label, Randomized PIX301 Trial. *Clin. Drug Investig* 2018; **38**: 527–533.
[72] PRATESI G, DE CESARE M, CASERINI C, PEREGO P, DAL BO L, POLIZZI D, SUPINO R, BIGIONI M, MANZINI S, IAFRATE E, SALVATORE C, CASAZZA A, ARCAMONE F, ZUNINO F. Improved efficacy and enlarged spectrum of activity of a novel anthracycline disaccharide analogue of doxorubicin against human tumor xenografts. *Clin. Cancer Res* 1998; **4(11)**: 2833–2839.
[73] QUIGLEY GJ, WANG AHJ, UGHETTO G, VAN DER MAREL G, VAN BOOM JH, RICH A. Molecular structure of an anticancer drug-DNA complex: Daunomycin plus d(CpGpTpApCpG). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 1980; **77**: 7204–7208.
[74] RA K, HAUTALA A, TORKKELL S, KANTOLA J, MA P, HAKALA J, YLIHONKO K. Characterization of mutations in aclacinomycin A-non-producing Streptomyces galilaeus strains with altered glycosylation patterns. *Microbiology* 2002; **148**: 3375- 3384.
[75] RAGAB AH, BOYETT JM, FRANKEL L, FALLETTA J. Rubidazone in the treatment of recurrent acute leukemia in children. A pediatric oncology group study. *Cancer* 1986; **57**: 1461–1463.
[76] RIVANKAR S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J. Cancer Res. Ther* 2014; **10**: 853–858.
[77] ROBERT J. Clinical Pharmacokinetics of Epirubicin. *Clin. Pharmacokinet.*1994; **26**: 428–438.
[78] ROCHETTE L, GUENANCIA C, GUDJONCIK A, HACHET O, ZELLER M, COTTIN Y, VERGELY C. Anthracyclines/trastuzumab: New aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci* 2015; **36**: 326–348.
[79] SALVATORELLI E, MENNA P, PAZ OG, CHELLO M, COVINO E, SINGER JW, MINOTTI G. The novel anthracenedione, pixantrone, lacks redox activity and inhibits doxorubicinol formation in human myocardium: Insight to explain the cardiac safety of pixantrone in doxorubicin-treated patients. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 2013; **344**: 467–478.
[80] SAMPI K, MASAOKA T, TAKAGI T, SAKAMOTO S, MIKUNI C, KANO Y. Aclarubicin-combined combination chemotherapy in patients with refractory or relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *Japanese J. Cancer Chemother* 1989; **16**: 79–82.
[81] SCULLY RE, LIPSHULTZ SE. Anthracycline cardiotoxicity in long-term survivors of childhood cancer. *Cardiovasc. Toxicol* 2007; **7**: 122–128.
[82] SEICEAN S, SEICEAN A, PLANA J., BUDD GT, MARWICK TH. Effect of statin therapy on the risk for incident heart failure in patients with breast cancer receiving anthracycline chemotherapy: An observational clinical cohort study. *J. Am. Coll. Cardiol* 2012; **60**: 2384–2390.
[83] SHABALALA S, LOUW J, MULLER CJF., JOHNSON R. Polyphenols, autophagy and doxorubicin--induced cardiotoxicity. *Life Sci* 2017; **180**: 160–170.
[84] SHAH S, CHIB R, RAUT S, BERMUDEZ J, SABNIS N, DUGGAL D, ET AL. Photophysical characterization of anticancer drug valrubicin in rHDL nanoparticles and its use as an imaging agent. *J Photochem Photobiol B Biol* 2016; **155**: 60–65.
[85] SHARMA P, ZARGAR-SHOSHTARI K, SEXTON WJ. Valrubicin in refractory non-muscle invasive bladder cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2015; **15(12)**: 1379–87.
[86] SHEPARD RC. Liposomal annamycin, a next generation anthracycline that overcomes MDR and has no cardiotoxicity with preliminary efficacy in the treatment of R/R AML. *Hematol. Rep* 2020; **12**: s1.
[87] SILVER RT, CASE DC, WHEELER RH, MILLER TP, STEIN RS, STUART JJ, PETERSON BA, RIVKIN SE, GOLOMB HM, COSTANZI JJ, ERSLEV AJ, REISMAN A, DUGAN M. Multicenter

clinical trial of mitoxantrone in non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease. *J. Clin. Oncol* 1991; **9**: 754–761.

[88] SINGH Y, ULRICH L, KATZ D, BOWEN P, KRISHNA G. Structural requirements for anthracycline--induced cardiotoxicity and antitumor effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1989; **100**: 9–23.

[89] SPETH PAJ, VAN HOESEL QGCM, HAANEN C. Clinical Pharmacokinetics of Doxorubicin. *Clin. Pharmacokinet* 1988; **15**: 15–31.

[90] SU L, ZHU X, GAO S, LI W, LIU X, TAN Y. High-dose versus standard-dose daunorubicin in induction therapy for young patients with de novo acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of randomised trials. *J. Chemother* 2016; **28**: 123–128.

[91] SZUŁAWSKA A, CZYŻ M. Molekularne mechanizmy działania antracyklin* Molecular mechanisms of anthracyclines action. *Postep. Hig. Med.. Dosw. (online)* 2006; **60**: 78-100.

[92] TAATJES DJ, GAUDIANO G, RESING K, KOCH TH. Alkylation of DNA by the anthracycline, antitumor drugs adriamycin and daunomycin. *J. Med. Chem* 1996; **39**: 4135–4138.

[93] TAATJES DJ, GAUDIANO G, KOCH TH. Production of formaldehyde and DNA-adriamycin or DNA-daunomycin adducts, initiated through redox chemistry of dithiothreitol/iron, xanthine oxidase/NADH/iron, or glutathione/iron. *Chem. Res. Toxicol* 1997; **10**: 953–961.

[94] TAN LL, LYON AR. Role of Biomarkers in Prediction of Cardiotoxicity During Cancer Treatment. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med* 2018; **20**: 55.

[95] THORN CF, OSHIRO C, MARSH S, HERNANDEZ-BOUSSARD T, MCLEOD H, KLEIN TE, ALTMAN RB. Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* 2011; **21**: 440–446.

[96] TSURUO T, IIDA H, TSUKAGOSHI S, SAKURAI Y. 4′-O-Tetrahydropyranyladriamycin as a Potential New Antitumor Agent. *Cancer Res* 1982; **42**: .

[97] UMEZAWA H, TAKAHASHI Y, KINOSHITA M, NAGANAWA H, MASUDA T, ISHIZUKA M, TATSUTA K, TAKEUCHI T. Tetrahydropyranyl derivatives of daunomycin and adriamycin. *J. Antibiot. (Tokyo)* 1979; **32**: 1082–1084.

[98] VASTI C, HERTIG CM. Neuregulin-1/erbB activities with focus on the susceptibility of the heart to anthracyclines. *World J. Cardiol* 2014; **6**: 653–62.

[99] VAYNBLAT M, SHAH HR, BHASKARAN D, RAMDEV G, DAVIS WJ, CUNNINGHAM JN, CHIAVARELLI M. Simultaneous angiotensin converting enzyme inhibition moderates ventricular dysfunction caused by doxorubicin. *Eur. J. Heart Fail* 2002; **4**: 583–586.

[100] WANG AH, UGHETTO G, QUIGLEY GJ, RICH A. Interactions between an Anthracycline Antibiotic and DNA: Molecular Structure of Daunomycin Complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2-Å Resolution. *Biochemistry* 1987; **26**: 1152–1163.

[101] WEI G, NI W, CHIAO JW, CAI Z, HUANG H, LIU D. A meta-analysis of CAG (cytarabine, aclarubicin, G-CSF) regimen for the treatment of 1029 patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J. Hematol. Oncol* 2011; **4**: 46.

[102] WETZLER M, THOMAS DA, WANG E, SHEPARD R, FORD LA, HEFFNER TL, PAREKH S, ANDREEFF M, O'BRIEN S, KANTARJIAN HM. Phase I/II trial of nanomolecular liposomal annamycin in adult patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk* 2013; **13**: 430–434.

[103] YAMAOKA T, HANADA M, ICHII S, MORISADA S, NOGUCHI T, YANAGI Y. Cytotoxicity of amrubicin, a novel 9-aminoanthracycline, and its active metabolite amrubicinol on human tumor cells. *Japanese J. Cancer Res* 1998; **89**: 1067–1073.

[104] YOUNG RC, OZOLS RF, MYERS CE. The Anthracycline Antineoplastic Drugs. *N. Engl. J. Med* 1981; **305**: 139–153;

[105] ZHANG JL, CAO YP, LI JG. Efficacy and Safety of Decitabine Combined with CAG (Cytarabine, Aclarubicin, G-CSF) for Patients with Intermediate or High Risk Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia: a Meta-Analysis. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* 2019; **27**: 494–503.

[106] ZHANG S, LIU X, BAWA-KHALFE T, LU LS, LYU YL, LIU LF, YEH ETH. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat. Med* 2012; **18**: 1639–1642.

[107] [ZHOU J, LI L, LI X, YU Q, CUI S, SHU K, LIU J, LIU J, DING D, DU T. Efficacy analysis of a novel thermochemotherapy scheme with pirarubicin for intermediate- and high-risk nonmuscle-invasive bladder cancer: a single-institution nonrandomized concurrent controlled trial. *Int. J. Hyperth* 2019; **36**: 868–875.
[108] ZIELINSKI R, GRELA K, SKORA S, FOKT I, SANDER M, DIDLUCH A, PRIEBE W. Liposomal annamycin inhibition of lung localized breast cancer. *Cancer Res* 2020; **80**: P2-15-03-P2-15–03.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano:02.09.2021
Przyjęto: 22.09.2021
Kamil Piska
Zakład Biochemii Farmaceutycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum
ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków
e-mail: kamil.piska@uj.edu.pl
tel.: 12 620 55 77

MOLEKULARNE PODŁOŻE OTYŁOŚCI: ROLA ADIPONEKTYNY, LEPTYNY, APELINY I CHEMERYNY W PATOGENEZIE OTYŁOŚCI

MOLECULAR BASIS OF OBESITY: ROLE OF ADIPONECTIN, LEPTIN, APELIN AND CHEMERIN IN THE PATHOGENESIS OF OBESITY

Wiktoria SKRZYPEK[1], Dawid DUDEK[1], Jan MIŁEK[1], Jędrzej KNAPIK[1], Urszula KOWALSKA[1], Maciej OWECKI[2]

[1]Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
[2]Katedra Medycyny Społecznej i Zakład Zdrowia Publicznego, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Streszczenie: Otyłość na przestrzeni lat, stała się problemem stale rozrastającym się na skalę światową. Z chorobą tą nierozerwalnie łączy się przyrost tkanki tłuszczowej oraz zaburzenia w wydzielaniu przez adipocyty hormonów. Zarówno nieprawidłowości w wydzielaniu, jak i niewłaściwe oddziaływanie adipocytokin na komórki docelowe, wiąże się z zaburzeniami w funkcji całego organizmu. Adiponektyna wpływa na poprawę insulinooporności oraz posiada działanie przeciwmiażdżycowe. Jej wydzielanie jest zmniejszone u osób z otyłością. Może to być jedną z przyczyn rozwoju chorób towarzyszących otyłości takich jak cukrzyca typu 2, czy nadciśnienie tętnicze. Z kolei leptyna jest hormonem oddziałującym na receptory w mózgu, dzięki czemu wzmaga uczucie sytości i zmniejszenie poboru pokarmu, a co za tym idzie zahamowanie przyrostu tkanki tłuszczowej i rozwoju otyłości. Apelina wytwarzana przez adipocyty wpływa na pracę mięśnia sercowego oraz powoduje wazodylację naczyń krwionośnych, dzięki czemu rozważa się jej przyszłościowe zastosowanie w terapii. Z otyłością związana jest także chemeryna, która wpływa na procesy zachodzące w tkance tłuszczowej. Uważa się, że ta adipocytokina wpływa na adipogenezę i przyrost tkanki tłuszczowej. Zaburzenia w ilości hormonów produkowanych przez komórki tkanki tłuszczowej, wpływają negatywnie na procesy metaboliczne zachodzące w organizmie oraz pośrednio przyczyniają się do pogłębienia otyłości, czy rozwoju dodatkowych jednostek chorobowych, w tym miażdżycy, nadciśnienia tętniczego oraz cukrzycy typu 2.

Słowa kluczowe: otyłość, adiponektyna, leptyna, apelina, chemeryna

Summary: Over the years, obesity has become a health issue that is constantly growing on a global scale. The disease is associated with the increase of adipose tissue and imbalance of the secretion of hormones by the adipocytes. Both secretory abnormalities and an inappropriate response of adipocytokines on target cells are associated with disturbances in the functions of the whole organism. Adiponectin improves insulin resistance and has an antiatherosclerotic effect. Its secretion is reduced

in obese people. This may be one of the reasons for the development of obesity-related diseases, such as type 2 diabetes or arterial hypertension. Leptin, in turn, is a hormone that affects brain receptors responsible for the feeling of fullness and results in reduced food intake, thus inhibiting the growth of adipose tissue and obesity. Apelin produced by adipocytes affects the work of the heart muscle and causes vasodilation of blood vessels, which is why its future therapeutic use is being considered. Obesity is also associated with chemerin, which affects the processes taking place in adipose tissue. This adipocytokine is believed to influence adipogenesis and fat gain. Disturbances in the amount of hormones produced by adipose tissue cells negatively affect the metabolic processes taking place in the body and indirectly contribute to the increase of obesity or the development of additional diseases, including atherosclerosis, hypertension and type 2 diabetes.

Keywords: obesity, adiponectin, leptin, apelin, chemerin

WSTĘP

Otyłość to przewlekła choroba, której zachorowalność w krajach rozwiniętych bardzo szybko rośnie. Otyłością nazywamy stan, w którym tkanka tłuszczowa stanowi więcej niż 30% masy ciała u kobiet, więcej niż 25% u mężczyzn lub wskaźnik BMI (Body Mass Index), czyli stosunek masy ciała w kilogramach do wzrostu w metrach podniesionego do kwadratu przekracza wartość 30 [11, 41, 73]. Na skutek zmieniającego się stylu życia i sposobu odżywiania, szacunkowe badania wskazują, że problem z otyłością ma około 20% populacji, co zalicza otyłość do chorób cywilizacyjnych. Światowa Organizacja Zdrowia mówi o globalnej epidemii otyłości podając dane z 2005 r. według których problem nadwagi dotykał 1,6 mld ludzi a otyłości 400 mln osób na całym świecie [38, 46,]. WHO zwraca uwagę na drastyczny wzrost zachorowalności, który w latach 1980-2008 miał doprowadzić do podwojenia się liczby chorych. WHO podaje, że na terenie Europy w przeciągu ostatnich 40 lat liczba otyłych dzieci wzrosła aż 10-krotnie [61]. W populacji osób dorosłych największy odsetek występuje w Stanach Zjednoczonych 35,9%, w Meksyku 30% i na Węgrzech 28,5%, natomiast w Polsce wynosi on 15,8% [54]. We wszystkich krajach szacowany jest dalszy wzrost odsetka otyłych osób. W zależności od rozmieszczenia gromadzonego nadmiaru tkanki tłuszczowej w organizmie rozróżnia się dwa typy otyłości. Otyłość gynoidalna polega na gromadzeniu się tkanki tłuszczowej w okolicach ud i pośladków, częściej występuje u kobiet niż u mężczyzn. Otyłość androidalna polega na gromadzeniu się tkanki tłuszczowej w okolicy jamy brzusznej. Ten typ otyłości występuję częściej u mężczyzn [30]. Otyłość androidalna ma bardziej negatywny wpływ na nasze zdrowie. Zespół metaboliczny występuje u 5,8 mln mieszkańców Polski w wieku 20-74 lat [8] u ponad 30% otyłych osób rozwija się głównie na skutek otyłości brzusznej. Badania pokazują, że wraz ze wzrostem obwodu pasa rośnie ryzyko wystąpienia insulinooporności, ryzyko wystąpienia zawału serca

i ogólne ryzyko przedwczesnego zgonu [48]. Raport WHO z 2007 roku [42] podaje, że jedynie na terenie Europy otyłość jest przyczyną ponad miliona zgonów rocznie. Wysokie poziomy otyłości u młodych osób znacznie skracają oczekiwaną długość ich życia [21]. Otyłość zwiększa poziom ryzyka chorób takich jak cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, choroba wieńcowa, choroba niedokrwienna serca czy poważnych zaburzeń w gospodarce hormonalnej. Te negatywne konsekwencje otyłości zmuszają nas do lepszego poznania przyczyn jej występowania w celu zapobiegania epidemii. Główną przyczyną otyłości jest dodatni bilans kaloryczny. Jest on spowodowany niezrównoważoną dietą, w której spożywamy zbyt dużo wysokokalorycznych produktów. Zwłaszcza niezdrowe są wysoko przetworzone produkty, zawierające duże ilości cukrów prostych i tłuszczów nasyconych. Zmiany w stylu życia sprawiły, że w populacji Europejskiej ponad 65% populacji prowadzi aktywność fizyczną na niewystarczającym poziomie, który ciągle spada, zwłaszcza wśród dzieci. Z raportu dla Ministerstwa Sportu [6] wynika, że jedynie 26% Polaków w wieku od 18 do 69 lat w czasie wolnym spełnia zalecenie WHO do poziomu aktywności fizycznej, natomiast wśród młodzieży szkolnej [6, 8, 21, 22, 26, 30, 42, 46, 48, 53, 54, 61] spełnia je jedynie 5,3% osób. Poziom aktywności fizycznej w wielu innych krajach Europy i Świata jest na jeszcze niższym poziomie. Ważnym czynnikiem jest też czynnik psychologiczno-społeczny (otyłość statystycznie koreluje z niskim poziomem wykształcenia i zarobków). Uważa się, że uwarunkowania genetyczne odpowiadają za około 20% przypadków otyłości.

Z otyłością związana jest nadmierna ilość tkanki tłuszczowej. Jest ona tworzona głównie przez adipocyty, komórki tkanki łącznej, komórki układu immunologicznego i komórek endotelium naczyniowego włókien nerwowych [26]. Każdy z elementów tworzących tkankę tłuszczową pełni funkcję wydzielniczą przez co tkanka tłuszczowa jest największym gruczołem endokrynnym w naszym organizmie [22, 53]. Wytwarza ona substancje zwane adipokinami. W ostatnich latach odkrywane jest coraz więcej adipokin, które pełnią różnego rodzaju funkcje regulacyjną oddziałującą na wiele narządów i tkanek. W niniejszej pracy opiszemy strukturę, funkcjonowanie oraz związek pomiędzy wpływem wybranych adipokin na różnego rodzaju patomechanizmy sprzyjające rozwoju otyłości i związanego z nim chorobami.

ADIPONEKTYNA

Adiponektyna, zwana również Acrp30, GBP-28, apM1 lub AdipoQ jest hormonem peptydowym zbudowanym z 244 aminokwasów, produkowanym przede wszystkim przez komórki tkanki tłuszczowej [58, 77]. Późniejsze badania udowodniły, że ta adipokina może być wytwarzana także przez osteoblasty, tkanki łożyska, miocyty, czy komórki miąższu wątroby. Hormon ten odgrywa istotą rolę

w regulacji metabolizmu, ponadto bierze udział w procesach przeciwzapalnych, jak i uwrażliwia tkanki na insulinę [1, 15].

Działanie adiponektyny w dużej mierze zależy od jej stężenia w osoczu. Pod tym względem występują różnice płciowe, gdzie wyższe stężenia tego białka zauważa się u kobiet w przeciwieństwie do mężczyzn. Uważa się, że wpływ na to mają hormony steroidowe- estrogen i testosteron. Regulację osoczowego poziomu adiponektyny, przypisuje się także składnikom dietetycznym, takim jak białko sojowe, czy oleje rybne, które zwiększają jej stężenie. Z kolei spożywanie posiłków wysokowęglowodanowych, działa negatywnie, obniżając ilość krążącej adipokiny [52]. Hipoadiponektynemię odnotowano przede wszystkim u osób otyłych, szczególnie tych, cierpiących na otyłość brzuszną, a także u pacjentów, u których zdiagnozowano choroby powiązane z otyłością m.in.: cukrzycę typu 2, nadciśnienie tętnicze, miażdżycę oraz zespół metaboliczny. Adiponektyna hamuje procesy glukoneogenezy i glikogenolizy zachodzące w wątrobie. Przyczynia się do tego zmniejszona ekspresja genów kodujących enzymy biorące udział w reakcjach glukoneogenezy m.in.: glukozo-6-fosfataza oraz karboksylaza fosfoenolopirogronianowa. U podstaw mechanizmu molekularnego tego zjawiska leży stymulacja fosforylacji, a tym samym aktywacji kinazy białkowej zależnej od AMP (AMPK). Dzięki temu hamowana jest produkcja glukozy wewnątrz organizmu [78]. Skutkiem tego jest poprawa nie tylko wątrobowej, ale także ogólnoustrojowej insulinooporności. W przypadku niskiego stężenia adiponektyny w ustroju, stwierdzono silne powiązanie z rozwojem cukrzycy typu 2. Wykazano także związek tej adipokiny z różnymi parametrami metabolizmu lipoprotein. Przeprowadzone badania wskazują na zwiększenie ekspresji genu ABCA1, a wraz z tym wzrost produkcji apo-AI, a także zmniejszenie produkcji apo-CIII w wątrobie. Procesy te prowadzą do podwyższenia poziomu HDL oraz spadku poziomu TG. Hormon ten, na drodze aktywacji PPARα, zwiększa zużycie energii i spalanie kwasów tłuszczowych, także zmniejszając ilość TG w wątrobie [69].

Adiponektyna, jako hormon pochodzący z tkanki tłuszczowej swoim działaniem wpływa także na inne komórki i narządy organizmu. Szczególną rolę odgrywa w chorobach będących następstwem otyłości [27]. Przeciwdziałając apoptozie, chroni podocyty nerki, dbając o jej funkcjonowanie w przypadku cukrzycy [75]. Poza tym wpływa na poprawę funkcji śródbłonka. Dzięki temu adiponektynie przypisuje się działanie przeciwmiażdżycowe. Jej niezwykłe działanie jest również powiązane z pracą serca. Badania wykazują, że u osób z hipoadiponektynemią powiązaną z otyłością, następuje zaostrzenie przerostu mięśnia sercowego. W makrofagach sprzyja ich różnicowaniu do rodzaju M2, hamując jednocześnie przeistaczanie do rodzaju M1, co warunkuje działanie przeciwzapalne. Adiponektyna reguluje także funkcje hormonalne tkanki tłuszczowej poprzez hamowanie wydzielania leptyny i czynników prozapalnych, takich jak TNF-α, czy IL-6, których wysoki poziom można zauważyć u osób otyłych. Wydzielanie tej adipoki-

ny w tkankach mięśni szkieletowych jest uzależnione od sposobu odżywiania oraz ćwiczeń [74]. Wysiłek fizyczny powodując spadek ilości adiponektyny, zmniejsza stan zapalny i insulinooporność, przyczyniając się do poprawy funkcji mięśni. Stymuluje AMPK, a tym samym wychwyt glukozy i utlenianie kwasów tłuszczowych. Bardzo wysoki poziom hormonu w tej tkance może mieć jednak działanie szkodliwe, obniżając średnicę miotuby, czy ilość białka [44]. Osoby z otyłością wykazują zmniejszone wydzielanie adiponektyny przez tkankę tłuszczową. Wpływa to na wiele zmian patofizjologicznych, które są powiązane z insulinoopornością, a także na wystąpienie cukrzycy typu 2, różnego rodzaju zapaleń, czy chorób związanych z układem krążenia. Natomiast spadek wagi, warunkuje wzrost ilości adiponektyny w ustroju, co korzystnie wpływa na redukcję wskaźnika masy ciała (BMI).

Kluczową rolę w funkcjonowaniu adiponektyny, a także jej oddziaływaniom na inne komórki i tkanki organizmu pełnią receptory AdipoR1, AdipoR2 oraz kadheryna T. Ze względu na wpływ AdipoR1 i AdipoR2 w regulację ekspresji genów i uwrażliwianiu na insulinę, stanowią znaczący czynnik patofizjologiczny w cukrzycy. AdipoR1 jest receptorem występującym powszechnie w organizmie, jednak największe jego ilości zaobserwowano w obrębie mięśni szkieletowych. Ekspresja receptora AdipoR2 jest natomiast ograniczona do tkanek wątroby. Po związaniu adiponektyny, receptory te uruchamiają dalsze ścieżki sygnalizacyjne. Badania wykazały, że nadekspresja AdipoR1 aktywuje AMPK, a dodatkowo hamuje glukoneogenezę zachodzącą w wątrobie i lipogenezę oraz wzmaga utlenianie kwasów tłuszczowych. Niedobór receptora AdipoR1, będzie zatem powiązany ze stanem insulinooporności. Natomiast funkcje AdipoR2 wciąż pozostają niejasne i wymagają dalszych badań [63]. Kadheryna T została zaklasyfikowana jako receptor dla jednej z form adiponektyny (HWM). Niedobory kadheryny T powodują zwiększone ilości krążącej HWM. Inaktywacja genu dla tego receptora, powoduje osłabienie wzrostu raka sutka, jednakże dokładna rola i powiązania kadheryny T z receptorami AdipoR1 i AdipoR2 są wciąż niejasne i pozostają do scharakteryzowania [69]. Zwiększenie liczby receptorów adiponektyny, bądź zastosowanie jej agonistów w terapii, uważa się za przyszłościowy krok w leczeniu osób z otyłością i chorobami z nią związanymi. Również badanie poziomu formy HWM adiponektyny może przynieść terapeutyczne zastosowanie. Jej dodatnie skolerowanie z wrażliwością na insulinę, może posłużyć jako marker w zespołach metabolicznych, bądź badaniach pacjentów z cukrzycą typu 2.

LEPTYNA

Leptyna stanowi hormon produkowany przez adipocyty oraz enterocyty, który odpowiada za regulację homeostazy energetycznej organizmu. Wpływa on między innymi na zmniejszenie ilości spożywanych posiłków (wzmaga uczucie syto-

ści wpływając na ośrodki w podwzgórzu), co pośrednio przekłada się na potencjalną redukcję tkanki tłuszczowej w związku z mniejszą ilością napływających z pożywienia kalorii. Właściwość ta może być potencjalnie wykorzystana w celu zwalczania otyłości, jednakże aby leptyna mogła wpłynąć na ośrodki w centralnym układzie nerwowym musi ona najpierw pokonać barierę krew-mózg (ang. *blood-brain barier*, BBB). Zaburzenia w transporcie tego hormonu przez BBB mogą zatem leżeć u podstaw oporności na leptynę, zwiększając tym samym ryzyko wystąpienia otyłości [37].

Czynnikiem, który nasunął ekspertom wątpliwości co do obligatoryjnego działania odchudzającego leptyny był jej podwyższony poziom w osoczu osób otyłych. Dodatkowo pacjenci ci nie reagowali na egzogenną leptynę. Stąd został wysunięty wniosek, iż to zaburzona dystrybucja wewnątrz organizmu pacjenta może leżeć u podstaw jego choroby metabolicznej. Początkowe badania skupiały się na przepuszczalności BBB dla osoczowej leptyny. Z racji, iż jej masa wynosi 16 kDa, wątpliwym było aby hormon ten był transportowany na zasadzie dyfuzji biernej. Postulowano więc istnienie specjalnego transportera dla leptyny, tym bardziej, że część badań zanotowała występowanie wysycenia dla przepuszczalności tego białka [5].

Odnotowywane zaburzenia w przepuszczalności bariery krew-mózg sięgały nawet 35% , co jeszcze bardziej ugruntowywało tezę wzrostu oporności BBB w odpowiedzi na zwiększoną ilość leptyny [4]. Co więcej, niektóre badania odnotowały stosunek stężeń leptyny w płynie mózgowo-rdzeniowym do jej stężenia osoczowego jest 4-5 razy niższy u osób ze stwierdzoną otyłością [12, 66]. Idąc tym tropem stwierdzono występowanie na powierzchni ependymoctów pokrywających komorę trzecią i czwartą swoistych białek receptorowych leptyny (OBR) [2] oraz ich krótszych izoform (OBRa, OBRc), których zmniejszenie ilości na powierzchni komórek wpływa na redukcję stężenia leptyny w mózgu myszy [35]. Rozważając zatem fakt, iż leptyna może być transportowana przez BBB za pomocą specjalnego błonowego receptora, trzeba wziąć pod uwagę prawa, jakim jest poddany tego typu transport. Mianowicie charakteryzuje się on występowaniem zjawisk desensytyzacja oraz regulacji w dół w przypadku podwyższonego stężenia liganda w osoczu, co odpowiedzialne jest za degradacje receptorów danego typu wewnątrz komórek. Wpływać to może znamiennie na rozpatrywany efekt oporności BBB wobec leptyny. Najnowsze przeprowadzane badania kwestionują jednak utartą tezę, jakoby wyłącznie wpływ zaburzonego transportu leptyny przez BBB oddziaływał na rozwój choroby metabolicznej, jaką jest otyłość. Początkowo przeprowadzane eksperymenty ukazały fakt, iż podanie myszom leptyny do komór mózgowych nie wpływało na zmniejszenie przyjmowania przez nie jedzenia, a tym samym nie oddziaływało na redukcję otyłości wywołanej u nich dietą [19]. Poza tym, w kolejnych badaniach, również na myszach z otyłością spowodowaną dietą, wykazano brak korelacji pomiędzy użyciem antagonistów

receptora leptyny a zmniejszeniem funkcjonalności endogennego hormonu [55]. Podobne wyniku uzyskano w oparciu o badania dla organizmu ludzkiego [57]. Co ciekawe, niedawno przeprowadzone innowatorskie badanie wykorzystujące technikę znakowania fluorescencyjnego leptyny wykazało, iż pomiędzy organizmem mysim stosującym zbilansowaną dietę i o normalnej masie, a modelem z „dietetyczną" otyłością nie występują diametralne różnice co do akumulacji hormonu w poszczególnych częściach mózgu (najwyższe stężenia osiągnięto w: wyniosłości pośrodkowej oraz splocie naczyniówkowym komór bocznych i trzeciej). Na tym jednak nie koniec, gdyż po poddaniu myszy z otyłością restrykcyjnej diecie bądź też działaniu odpowiednich środków farmakologicznych zwiększyło ilość zarówno leptyny jak i jej receptora w poszczególnych częściach mózgu. Zjawisko to wskazuje na utrzymanie akumulacji leptyny w stanie otyłości na stałym poziomie w miejscach o jej fizjologicznie największym działaniu w kontroli metabolizmu i masy ciała [33].

Specyfika leczenia otyłości z zastosowaniem mechanizmów rządzącymi biochemią i kinematyką leptyny opiera się głównie na zwiększeniu jej przepuszczalności przez BBB z zastosowaniem jej agonistów lub poprzez zwiększenie jej stabilności i czasu połowicznego trwania [37]. Kolejnymi czynnikami wpływającymi na otyłość mogą być zarówno niedobory tegoż hormonu jak i receptora dla niego, wynikający z wrodzonych zaburzeń genetycznych bądź też nabytych zaburzeń endokrynologicznych. Zmniejszona ilość leptyny lub brak jej oddziaływania z receptorem przyczyniają się do zwiększenia podaży jedzenia oraz rozwoju nadwagi/otyłości [7]. Do stosunkowo rzadko spotykanego schorzenia należy wrodzony niedobór leptyny, wynikający z mutacji utraty sensu w genie kodującym leptynę. Dotyka to najczęściej rodzin, w których rodzice są ze sobą spokrewnieni. Poza fenotypem związanym z zaawansowaną otyłością już we wczesnym wieku dziecięcym, obserwuje się także u takich pacjentów znaczne niedobory immunologiczne, mogące prowadzić w młodości nawet do śmierci z powodu infekcji. Ponadto odnotowuje się hipogonadyzm, niedobory hormonów tarczycy, zaburzenie osi renina-aldosteron, dysfunkcje układu współczulnego i wiele innych patologii związanych z samym zespołem metabolicznym jak na przykład zwiększone ryzyko chorób sercowo -naczyniowych i hiperlipidemia [56]. Chorobliwie otyłe dzieci z tego typu schorzeniem skutecznie leczy się podskórnymi iniekcjami rekombinowanej ludzkiej leptyny. Efekt tej terapii znacznie wpływa na poprawę stanu pacjentów pod względem różnorodnych zaburzeń związanych z mutacją. Dotyczy to zarówno nieprawidłowości metabolicznych, jak hiperinsulnemia czy hiperlipidemia, ale także endokrynologicznych, podnosząc poziomy hormonów tarczycy oraz gonadotropin. Poprawie ulegają także dysfunkcje neuroendokrynologiczne. Jednakże, najważniejsze działanie danej kuracji przypisuje się podniesieniu poziomu krążących we krwi limfocytów T CD4(+) , których ilość była niebezpiecznie obniżona w opisywanej chorobie genetycznej [23]. Inną zmianą

skutkującą nieadekwatną odpowiedzią organizmu na leptynę jest mutacja w genie kodującym jej receptor. W tym przypadku również obserwujemy znamienne podniesienie masy ciała związane z otyłością i inne towarzyszące jej nieprawidłowości [24]. Kolejną przyczyną niedoboru leptyny może być wrodzona lub nabyta utrata tkanki tłuszczowej, ograniczona jedynie do konkretnych obszarów, bądź też dotycząca całego ciała (tzw. lipoatrofia). Często spotyka się tą formę dysfunkcji tkanki tłuszczowej w przypadku zakażenia wirusem niedoboru odporności – HIV. Zespół ten nazywany jest w skrócie HALS (ang. *HIV-associated lipodystrophy syndrome*) i występuje wśród znacznego odsetka osób leczonych na HIV dłużej niż rok [47]. Ponadto, do niedoborów leptyny mogą prowadzić nadmierne ćwiczenia oraz anorexia nervosa, tym samym zaburzając prawidłowe pokwitanie i homeostazę neuroendokrynologiczną [13].

APELINA

Apelina jest adipocytokiną odkrytą podczas poszukiwań ligandu dla receptora APJ. Jej prepropeptyd ma 77 aminokwasów, a aktywne formy znajdują się na C-końcu [71]. Jako że zawiera on wiele możliwych miejsc cięcia, apelina posiada wiele izoform różniących się ilością aminokwasów oraz aktywnością [32]. Jest ona produkowana w wielu tkankach organizmu, przede wszystkim sercu, nerkach, płucach, nasieniowodach, gonadach, różnych strukturach mózgu, mięśniach, ścianie żołądka, śródbłonku małych tętnic i niektórych żył oraz tkance tłuszczowej [9, 32, 45, 72]. Jest ona również wytwarzana w gruczole mlekowym, szczególnie w okresie okołoporodowym, co umożliwia jej wydzielanie do mleka [32]. Za jej produkcję w tkance tłuszczowej odpowiadają nie tylko adipocyty, ale również inne znajdujące się tam komórki. Wytwarzanie i wydzielanie apeliny jest regulowane przez insulinę, która zwiększa te procesy w tkankach na nią wrażliwych poprzez szlaki związane z kinazami: PI3K, PKC oraz MAPK [9].

Po dożylnym podaniu apeliny gryzoniom następował u nich spadek ciśnienia tętniczego [10, 14, 36, 45, 72]. Dzieje się tak ponieważ poprzez kinazę Akt powoduje ona fosforylację i aktywację endotelialnej syntazy tlenku azotu, która zwiększa stężenie NO w osoczu i przez to również wazodylację [36, 39, 72]. Myszy pozbawione receptora APJ miały jednak prawidłowy poziom ciśnienia krwi, co sugeruje że działanie apeliny nie jest niezbędne do jego regulacji [36]. W niektórych przypadkach jej wstrzyknięcie zwiększało tętno [14, 45], a w innych nie [10, 36, 72]. Takie rozbieżności w wynikach można wytłumaczyć tym, że apelina wpływa na nie tylko pośrednio poprzez wywołanie hipotensji pobudzającej nerwy współczulne, a niektóre gryzonie miały po prostu mniej aktywny system baroreceptorów. Tezę tę potwierdza fakt zmniejszenia jej wpływu na tętno poprzez zahamowanie aktywności nerwów współczulnych [14]. Ponad to apelina obniża również

średnie ciśnienie żylne [14]. Jej wstrzykiwanie nie zmienia zbytnio ilości spożywanego pokarmu [34, 70], ale zwiększa pragnienie [45,70]. Długotrwałe dootrzewnowe podawanie apeliny doprowadziło do zmniejszenia masy tkanki tłuszczowej, ilości zawartych w niej triacyloglicerolі, wielkości adipocytów i osoczowego stężenia insuliny oraz szybszego pozbywania się glukozy z krwi w dootrzewnowym teście tolerancji glukozy. Sugeruje to, że apelina zwiększa wrażliwość tkanek na insulinę [34]. Zwiększa ona ekspresję białek rozprzęgających – UCP1 w brunatnej tkance tłuszczowej i UCP3 w mięśniach, co powoduje zwiększenie temperatury ciała i poboru tlenu oraz może tłumaczyć obniżenie masy tkanki tłuszczowej. Zmniejsza ona także współczynnik oddechowy, co może wskazywać na zwiększenie zużycia tłuszczów w stosunku do cukrów [34]. Apelina przyczynia się również do regulacji gospodarki hormonalnej. Zwiększa osoczowe stężenie ACTH i kortykosteronu, a zmniejsza prolaktyny, LH i FSH. Powoduje wzrost wydzielania kortykoliberyny i wazopresyny [70]. Ma również wpływ na inne adipocytokiny. Jej długotrwałe podawanie doprowadziło do zwiększenia stężenia osoczowej apeliny, a spadku leptyny [34]. Ponad to apelina zmniejszyła w śledzionie produkcję cytokin IFN-γ, IF-2, IF-4 i proliferację jej komórek [32].

Okazuje się, że u ludzi apelina nie wpływa na ciśnienie krwi aż tak znacząco. W wielu przypadkach pozostawało ono niezmienne po jej dożylnym podaniu, szczególnie u młodych i zdrowych osób [29, 39, 40]. Podobnie tętno w większości przypadków nie ulegało zmianom, a czasami było tylko lekko podwyższone [29, 39, 40]. Apelina, tak samo jak u szczurów powoduje wazodylację [39, 40]. Po jej wstrzyknięciu następował wzrost przepływu krwi przez pobliskie tętnice, łącznie z przepływem wieńcowym [39, 40]. Zwiększa ona tempo narastania ciśnienia do wartości maksymalnej w lewej komorze, kurczliwość serca, pojemność minutową serca i wskaźnik sercowy. Zmniejsza obwodowy opór naczyniowy, obciążenie wstępne i następcze, maksymalne ciśnienie skurczowe wewnątrz lewej komory i jej ciśnienie późnorozkurczowe. Sugeruje to, że apelina powoduje wenodylację żył pojemnościowych [40]. Apelina u ludzi nie wpływa na stężenie wazopresyny i mózgowego peptydu natriuretycznego [40]. Podobnie jak u myszy przyczynia się do zwiększania wrażliwości tkanek na insulinę [29]. Istnieją zarówno artykuły, w których wykazano powiązanie między stężeniem apeliny a insulinoopornością [18], jak i takie w których takiego związku nie zauważono [60]. Prawdopodobnie jest to spowodowane tym, że wraz ze zmniejszaniem się wrażliwości tkanek na insulinę, rośnie jej stężenie. Doprowadza to do wzrostu apeliny, która jednak z jakiegoś powodu nie działa dobrze u niektórych osób. Być może jest to związane z rozwijaniem się u nich apelinooporności [29]. Podobnie istnieją artykuły, w których za pomocą statystyki wykazano związki pomiędzy osoczowym stężeniem apeliny a nadwagą, BMI, ciśnieniem krwi oraz stężeniem cholesterolu, triacyloglicerolі i glukozy [18, 67], a także takie w których tych związków nie zaobserwowano [60].

Opracowano również agonistę receptora APJ i nazwano go MM07. U szczurów, podobnie jak apelina, zwiększa pojemność minutową serca oraz zmniejsza opór obwodowy. Nie wpływa jednak na ciśnienie krwi. U ludzi powoduje wzrost jej przepływu oraz wazodylację, ale w przeciwieństwie do apeliny, wyłącznie w miejscu wstrzyknięcia. Ma on również większy okres półtrwania. Dzięki temu, że powoduje mniejszą niż apelina internalizację receptora APJ, nie prowadzi do desensytyzacji i działa tak samo przy kolejnych podaniach. Być może będzie on mógł być zastosowany w leczeniu niektórych chorób sercowo-naczyniowych [10].

Trwają prace nad możliwościami wykorzystania wiedzy o apelinie i jej receptorze w celach terapeutycznych. Wykazano, że u myszy z zespołem niewydolności oddechowej (ARDS) jej stężenie jest obniżone, ale zwiększa się podczas leczenia Cannabidiolem. Być może przyczynia się ona do korzystnego działania leku. Niewykluczone również, że można za pomocą pomiarów jej stężenia wcześniej wykrywać ARDS oraz określać skuteczność przeprowadzanej terapii [64]. U szczurów podawanie apeliny powodowało zmniejszenie negatywnego oddziaływania na serce Isoproterenolu. Uszkodzenia powodowane przez tą substancję nie były aż tak wielkie jak w próbie kontrolnej. Efekt ten był szczególnie widoczny przy jednoczesnym podawaniu angiotensyny 1-7 [68]. Prawdopodobnie apelina znajdzie wkrótce swoje zastosowanie w lecznictwie.

CHEMERYNA

Gen kodujący chemerynę TIG2 został odkryty w 1997 roku podczas badań nad próbkami skórnymi osób chorujących na łuszczycę. W próbkach pobranych z miejsc gdzie nie było zmian łuszczycowych ekspresja tego genu była wysoka, zdecydowanie niższa była natomiast w próbkach ze zmian chorobowych. Stąd pierwotne przypuszczenia, że białko to odpowiada za utrzymanie prawidłowego stanu skóry [51]. Kolejno w 2003 roku dwa niezależne od siebie zespoły określiły produkt ekspresji genu TIG2- chemerynę jako ligand sierocego receptora CMKLR1 [76].

Chemeryna jest produkowana przez adipocyty jako nieaktywne białko o nazwie preprochemeryna i masie 16kDa. Jest ono zbudowane z 163 aminokwasów. Po odcięciu N-końcowego polipeptydu, zbudowanego z 20 aminokwasów, powstaje prochemeryna, która nadal jest praktycznie nieaktywna biologicznie. Aktywacja prochemeryny jest możliwa przez ograniczoną proteolizę C-końcowego fragmentu przez obecne we krwi lub tkankach proteazy, które biorą udział m.in. w reakcjach zapalnych organizmu [17]. Stopień aktywności powstałej chemeryny zależy od długości odłączonego łańcucha polipeptydowego (najbardziej aktywna – Chem 157, najmniej aktywna – Chem 152) [79].

Obecność chemeryny jest niezbędna do przekształcenia się preadipocytów w adipocyty, a co za tym idzie przyrostu tkanki tłuszczowej [50]. Należy jednak pamiętać, że proces ten zależy jeszcze od angiogenezy i tworzenia się naczyń włosowatych [43]. Chemeryna jest adipokiną produkowaną przez adipocyty i jednocześnie wpływającą na adipogenezę oraz metabolizm już dojrzałych komórek tkanki tłuszczowej [28]. Może działać zarówno parakrynnie, jak i autokrynnie [62]. Już na tym poziomie możemy wysunąć wniosek, że chemeryna przez stymulację adipogenezy może mieć bezpośredni wpływ na rozwój otyłości.

Istnieje także hipoteza, że chemeryna stymuluje lipolizę. Wiemy, że pobudzenie receptorów CMKLR1 przez ich ligand czyli chemerynę powoduje fosforylację kinaz MAP p42 i p44, które biorą udział w lipolizie. Stąd hipoteza, że chemeryna reguluje także rozkład tłuszczy [31, 59]. Wiemy też, że uwalnianie glicerolu w pożywce hodowanej przez 24 godziny było znacząco wyższe przez stosowanie chemeryny, co potwierdza powyższą tezę, gdyż glicerol jest produktem rozkładu tłuszczy [62].

Na badaniach przeprowadzonych na myszach wykazano także, że niezależnie od diety (niskotłuszczowej lub bogatotłuszczowej) osobniki nieposiadające receptora chemeryny mają zdecydowanie mniejsza masę ciała i zawartość tkanki tłuszczowej pochodzącej z diety, niż osobniki kontrolne. Było to spowodowane tym iż brak receptorów chemeryny powoduje zmniejszenie sekrecji insuliny w odpowiedzi na wysokie stężenie glukozy. Możemy na tej podstawie przypuszczać, że działanie chemeryny może zwiększać łaknienie i powodować w konsekwencji przyjmowanie większej ilości pokarmu, co z kolei ma bezpośredni wpływ na rozwój otyłości i chorób z nią związanych [20].

Dowiedziono także, że chemeryna uczestniczy w reakcji zapalnej organizmu. W zależności od rodzaju chemeryny, a dokładnie od jej długości, może stymulować te reakcję albo być jej inhibitorem. Do pierwszej grupy możemy zaliczyć Chem-157, która ma działanie chemotaktyczne i uczestniczy we wczesnych etapach reakcji zapalnej. Do drugiej grupy natomiast zaliczamy Chem-154, która z kolei hamuje aktywowanie makrofagów [16].

Chemeryna łączy się z receptorem CMKLR, który współdziała z białkiem G. Jest to receptor o budowie serpentynowej, który siedmiokrotnie przecina błonę komórkową, a w części cytoplazmatycznej działa z białkiem G [49]. Aktywacja receptora chemeryny powoduje wewnątrzkomórkowe uwalnianie wapnia, hamowanie gromadzenia się cAMP i fosforylację kinaz MAP p42 i p44. Dzieję się to poprzez klasę Gi heterotrimerycznych białek G [76]. Zmiany te prowadzą do chemotaksji komórek układu odpornościowego do miejsca zdarzenia. Receptory dla chemeryny u człowieka nie znajdują się tylko na błonach adipocytów w czasie ich różnicowania się. Występują także na makrofagach tkankowych oraz na plazmocytoidalnych komórkach dendrytycznych [81]. Co ciekawe receptor CMKLR1

jest wykorzystywany jako koreceptor przez wirusy takie jak HIV-1 czy SIV, które dzięki niemu wnikają do komórki gospodarza [65]. Jak się okazuje CMKLR nie jest jedynym receptorem chemeryny. Jest nim jeszcze CCRL2. Można go znaleźć na powierzchni takich komórek jak mastocyty, neutrofile, monocyty czy komórki T. Chemeryna jednak, po przyłączeniu się do niego, nie wywołuje analogicznej kaskady reakcji jak przypadku receptora CMKLR1. Chemeryna nie jest internalizowana. CCRL2 może jedynie służyć jako receptor zwiększający stężenie prochemeryny w danych tkankach. Przykładem są stromalne komórki płuc i serca, w których ekspresja CCRL2 służy jako rezerwuar chemeryny [80].

PODSUMOWANIE

Wszystkie wymienione adipokiny są cały czas intensywnie badane w celu ustalenia ich wpływu na mechanizm powstawania otyłości i inne zmiany metaboliczne. Z adiponektyną, jako hormonem tkanki tłuszczowej, wiąże się duże nadzieje w możliwości jej zastosowania, jako środek terapeutyczny, a także przewidujący w otyłości i insulinooporności. Pomimo specyficznego działania, jej tkanki docelowe, są rozmieszczone w całym organizmie. Zatem zwiększenie ilości samego hormonu, czy wpływ na jego receptory może być kluczowe w terapii osób z cukrzycą typu 2, czy miażdżycą [25]. Jej działanie przeciwzapalne i przeciwapoptotyczne sprzyja także ochronie nerek, serca, czy naczyń krwionośnych [75]. Terapeutyczne zastosowanie adiponektyny może więc poprawić stan wielu narządów osób otyłych, u których jej poziomy są znacznie obniżone [3, 52]. Leptyna natomiast stanowi hormon o szerokim spektrum działania dążącym do utrzymania prawidłowej homeostazy energetycznej organizmu. Wszelkie nieprawidłowości pojawiające się na którymś z etapów wytwarzania, transportu oraz odbierania bodźca prowadzić może do poważnych konsekwencji zdrowotnych, w tym do rozwoju otyłości. Elementarne zaburzenia, stanowiące podstawę współczesnej wiedzy w kwestii powiazania leptyny z otyłością, to dysfunkcja w produkcji hormonu lub jego receptora, zmniejszona przepuszczalność BBB wobec leptyny – obecnie intensywnie badana, gdyż możliwe są inne przyczyny upośledzonego transportu leptyny. Środki farmakologiczne stosowane w celach terapeutycznych dla pacjentów dotkniętych schorzeniami wywołanymi dysfunkcją hormonu zależą od pierwotnej przyczyny patologii. Wymienić tu można podskórną iniekcje rekombinowanej ludzkiej leptyny, jeśli stwierdzony jest jej brak bez dysfunkcji receptora oraz leki uskuteczniające przechodzenie tegoż białka przez BBB. Apelina jest ligandem receptora APJ, wytwarzanym w licznych tkankach organizmu. Jej wytwarzanie i wydzielanie jest regulowane przez insulinę. Apelina aktywuje endotelialną syntazę tlenku azotu, zwiększa stężenie NO i powoduje wazodylację. Może przez to obniżać ciśnienie krwi u gryzoni, a czasem również

u ludzi. Wpływa ona także na inne parametry krążeniowe, takie jak kurczliwość serca, czy obciążenia wstępne i następcze oraz zwiększa wrażliwość tkanek na insulinę. Obecnie trwają badania nad wykorzystaniem jej oraz receptora APJ w celu leczenia różnych chorób. W kontekście otyłości istotnym jest fakt, że chemeryna jest białkiem, które działa na tę samą tkankę, przez którą jest syntetyzowana- na tkankę tłuszczową. Wysokie stężenie chemeryny, która jako białko umożliwiające przekształcenie proadipocytów w adipocyty, powoduje progresję przyrastania masy tkanki tłuszczowej. Przypuszcza się także, że wysoki poziom chemeryny może powodować wzrost łaknienia, co także przekłada się na duże ryzyko otyłości.

LITERATURA

[1] ACHARI AE, AND JAIN SK. Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *Int J Mol Sci* 2017; **18**.

[2] BALLAND E, DAM J, LANGLET F, CARON E, STECULORUM S, MESSINA A, ET AL. Hypothalamic Tanycytes Are an ERK-Gated Conduit for Leptin into the Brain. *Cell Metab* 2014; **19**: 293-301.

[3] BALSAN GA, VIEIRA JL DA C, OLIVEIRA AM DE, PORTAL VL, BALSAN GA, VIEIRA JL DA C, ET AL. Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. *Rev Assoc Médica Bras* 2015; **61**: 72-80.

[4] BANKS WA, DIPALMAWR, AND FARRELL CL. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity☆. *Peptides* 1999; **20**: 1341-1345.

[5] BANKS WA, KASTIN AJ, HUANG W, JASPAN JB, AND MANESS LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin, *Peptides* 1996; **17**: 305-311.

[6] BIERNAT E. Rekreacyjna aktywność fizyczna Polaków na tle Europy.2012.

[7] BLUHER S, SHAH S, AND MANTZOROS CS. Leptin Deficiency: Clinical Implications and Opportunities for Therapeutic Interventions, *J. Investig. Med.* 2009; **57**: 784-788.

[8] BOGDAN W, ZDROJEWSKI T, SYGNOWSKA E, BIELA U, DRYGAS W, TYKARSKI A, TENDERA M, BRODA G. Epidemiologia zespołu metabolicznego w Polsce. Wyniki programu WOBASZ, (n.d.).

[9] BOUCHER J, MASRI B, DAVIAUD D, GESTA S, GUIGNE C, MAZZUCOTELLI A, ET AL. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity, *Endocrinology* 2005; **146**: 1764-1771.

[10] BRAME AL, MAGUIRE JJ, YANG P, DYSON A, TORELLA R, CHERIYAN J, ET AL. Design, characterization, and first-in-human study of the vascular actions of a novel biased apelin receptor agonist, *Hypertens. Dallas Tex 1979* 2015; **65**: 834-840.

[11] BUKSIŃSKA-LISIK M, LISIK W, AND ZALESKA T. Obesity – multidisciplinary disorder, *Przew. Lek. GPs* 2006; **9**: 72-77.

[12] CARO JF, KOLACZYNSKI JW, NYCE MR, OHANNESIAN JP, OPENTANOVA I, GOLDMAN WH, ET AL. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance, *The Lancet* 1996; **348**: 159-161.

[13] CHAN JL, AND MANTZOROS CS. Role of leptin in energy-deprivation states: normal human physiology and clinical implications for hypothalamic amenorrhoea and anorexia nervosa, *The Lancet* 2005; **366**: 74-85.

[14] CHENG X, CHENG XS, AND PANG CCY. Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats, *Eur. J. Pharmacol 2003;* **470**: 171-175.

[15] CHOI HM, DOSS HM, AND KIM KS. Multifaceted Physiological Roles of Adiponectin in Inflammation and Diseases, *Int. J. Mol. Sci.* 2020 **21** .

[16] DU XY, AND LEUNG LLK. Proteolytic regulatory mechanism of chemerin bioactivity, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2009; **41**: 973-979.
[17] DU XY, ZABEL BA, MYLES T, ALLEN S.J, HANDEL TM, LEE PP, ET AL. Regulation of chemerin bioactivity by plasma carboxypeptidase N, carboxypeptidase B (activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), and platelets, *J. Biol. Chem.* 2009; **284**: 751-758.
[18] EL W, EL-KASSAS MA, KAMHAWY GM, GALAL AH, NASSAR EM, HAMMAD MS, ET AL. Serum Apelin and Obesity-Related Complications in Egyptian Children, *Open Access Maced. J. Med. Sci.* 2018; **6**: 1354-1358.
[19] EL-HASCHIMI K, PIERROZ DD, HIELMAN SM, BJORBEK C, AND FLIER JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity, *J. Clin. Invest.* 2000; **105**: 1827-1832.
[20] ERNST MC, HAIDL ID, ZUNIGA LA, DRANSE HJ, ROURKE JL, ZABEL BA, ET AL. Disruption of the chemokine-like receptor-1 (CMKLR1) gene is associated with reduced adiposity and glucose intolerance, *Endocrinology* 2012; **153**: 672-682.
[21] EUGENIA EC1, RODRIGEZ C, WALKER-THURMOND K, THUN MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults – PubMed, (n.d.).
[22] FAIN JN, MADAN AK, HILER ML, CHEEMA P, AMD BAHOUTH SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans, *Endocrinology* 2004; **145**: 2273-2282.
[23] FAROOQI IS, MATARESE G, LORD GM, KEOGH JM., LAWRENCE E, AGWU C, ET AL. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency, *J. Clin. Invest.* 2002; **110**: 1093-1103.
[24] FAROOQI IS, WANGENSTEEN T, COLLINS S, KIMBER W, MATARESE G, KEOGH JM, ET AL. Clinical and Molecular Genetic Spectrum of Congenital Deficiency of the Leptin Receptor, *N. Engl. J. Med.* 2007; **356**: 237-247.
[25] FIASCHI T. Mechanisms of Adiponectin Action, *Int. J. Mol. Sci.* 2019; **20**.
[26] FRAYN KN, KARPE F, FIELDING BA, MACDONAL IA, AND COPPACK SW. Integrative physiology of human adipose tissue, *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 2003; **27**: 875-888.
[27] FRUHBECK G, CATALAN V, RODRIGUEZ A, AND GOMEZ-AMBROSI J. Adiponectin-leptin ratio: A promising index to estimate adipose tissue dysfunction. Relation with obesity-associated cardiometabolic risk, *Adipocyte* 2017; **7**: 57-62.
[28] GORALSKI KB, MCCARTHY TC, HANNIMAN EA, ZABEL BA, BUTCHER EC, PARLEE SD, ET AL. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism, *J. Biol. Chem.* 2007; **282**: 28175-28188.
[29] GOURDY P, CAZALS L, THALAMAS C, SOMMET A, CALVAS F, GALITZKY M., ET AL. Apelin administration improves insulin sensitivity in overweight men during hyperinsulinaemic-euglycaemic clamp, *Diabetes Obes. Metab.* 2018; **20**: 157-164.
[30] GRAŻYNA SIKORSKA-WIŚNIEWSKA. Otyłość i Nadwaga, (n.d.); **10**.
[31] GREENBERG AS, SHEN WJ, MULIRO K, PATEL S, SOUZA SC, ROTH RA, ET AL. Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway, *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 45456-45461.
[32] HABATA Y, FUJII R, HOSOYA M, FUKUSUMI S, KAWAMATA Y, HINUMA S, ET AL. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum, *Biochim. Biophys. Acta* 1999; **1452**: 25-35.
[33] HARRISON L, SCHRIEVER SC, FEUCHTINGER A, KYRIAKOU E, BAUMANN P, PFUHLMANN K, ET AL. Fluorescent blood–brain barrier tracing shows intact leptin transport in obese mice, *Int. J. Obes.* 2019; **43**: 1305-1318.
[34] HIGUCHI K, MASAKI T, GOTOH K, CHIBA S, KATSURAGI I, TANAKA K, ET AL. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice, *Endocrinology* 2007; **148**: 2690-2697.

[35] HILEMAN SM, PIERROZ DD, MASUZAKI H, BJORBEK C, EL-HASCHIMI K, BANKS WA, ET AL. Characterizaton of Short Isoforms of the Leptin Receptor in Rat Cerebral Microvessels and of Brain Uptake of Leptin in Mouse Models of Obesity, *Endocrinology* 2002; **143**: 775-783.
[36] ISHIDA J, HASHIMOTO T, HASHIMOTO Y, NISHIWAKI S, IGUCHI T, HARADA S, ET AL. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure in vivo, *J. Biol. Chem.* 2004; **279**: 26274-26279.
[37] IZQUIERDO AG, CRUJEIRAS AB, CASANUEVA FF, AND CARREIRA MC. Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later?, *Nutrients* 2019; **11**: 2704.
[38] JAMES WPT. The epidemiology of obesity: the size of the problem, *J. Intern. Med.* 2008; **263**: 336-352.
[39] JAPP AG, CRUDEN NL, AMER DAB, LI VKY, GOUDIE EB, JOHNSTON NR, ET AL. Vascular effects of apelin in vivo in man, *J. Am. Coll. Cardiol.* 2008; **52**: 908-913.
[40] JAPP AG, CRUDEN NL, BARNES G, VAN GERMEN N, MATHEWS J, ADAMSON J, ET AL. Acute cardiovascular effects of apelin in humans: potential role in patients with chronic heart failure, *Circulation* 2010; **121**: 1818-1827.
[41] JURUĆ A, AND BOGDAŃSKI P. Otyłość i co dalej? O psychologicznych konsekwencjach nadmiernej masy ciała, *Forum Zaburzeń Metab.* 2010; **1**: 210-219.
[42] KATSIRI A. WORLD HEALTH ORGANIZATION, (n.d.); **7**.
[43] KAUR J, ADYA R, TAN BK, CHEN J, AND RANDEVA HS. Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; **391**: 1762-1768.
[44] KRAUSE MP, MILNE KJ, AND HAWKE TJ. Adiponectin—Consideration for its Role in Skeletal Muscle Health, *Int. J. Mol. Sci.* 2019; **20**.
[45] LEE, DK, CHENG R, NGUYEN T, FAN T, KARIYAWASAM AP, LIU Y, ET AL. Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor, *J. Neurochem.* 2000; **74**: 34-41.
[46] MANIECKA-BRYLA I. Epidemia otyłości w XXI wieku, *Zdr. Publiczne Pol. Tow. Hig.* 2009; **119**: 207-212.
[47] MANTZOROS CS. Whither Recombinant Human Leptin Treatment for HIV-Associated Lipoatrophy and the Metabolic Syndrome?, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2009; **94**: 1089-1091.
[48] MARTA P, FERENC T, KOWALSKI J. Zespół metaboliczny. Część I: Definicje i kryteria rozpoznawania zespołu metabolicznego. Epidemiologia oraz związek z ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych i cukrzycy typu 2. (n.d.).
[49] METHNER A, HERMEY G, SCHINKE B, AND HERMANS-BORGMEYER I. A novel G protein-coupled receptor with homology to neuropeptide and chemoattractant receptors expressed during bone development, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; **233**: 336-342.
[50] MURUGANANDAN S, PARLEE SD, ROURKE JL, ERNST MC, GORALSKI KB, AND SINAL CJ. Chemerin, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) target gene that promotes mesenchymal stem cell adipogenesis, *J. Biol. Chem.* 2011; **286**: 23982-23995.
[51] NAGPAL S, PATEL S, JACOBE H, DISEPIO D, GHOSN C, MALHOTRA M, ET AL. Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin, *J. Invest. Dermatol.* 1997; **109**: 91-95.
[52] NIGRO E, SCUDIERO O, MONACO ML, PALMIERI A, MAZZARELLA G, COSTAGLIOLA C, ET AL. New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases, *BioMed Res. Int.* 2014; **2014**.
[53] OLSZANECKA-GLINIANOWICZ M, KOCEŁAK P, ORLIK B, HANDZIK G, AND JUSZCZYK Ł. Nowe adipokiny – korzystne czy niekorzystne w aspekcie patogenezy insulinooporności?, *Endokrynol. Otyłość Zaburzenia Przemiany Materii* 2009; **5**: 236-244.
[54] ORGANIZACJA WSPÓŁPRACY GOSPODARCZEJ I ROZWOJU. OECD Overweight and obesity in OECD Factbook.2013.
[55] OTTAWAY N, MAHBOD P, RIVERO B, NORMAN LA, GERTLER A, D'ALESSIO DA, ET AL. Diet-Induced Obese Mice Retain Endogenous Leptin Action, *Cell Metab.* 2015; **21**: 877-882.

[56] OZATA M, OZDEMIR IC, AND LICINO J. Human Leptin Deficiency Caused by a Missense Mutation: Multiple Endocrine Defects, Decreased Sympathetic Tone, and Immune System Dysfunction Indicate New Targets for Leptin Action, Greater Central than Peripheral Resistance to the Effects of Leptin, and Spontaneous Correction of Leptin-Mediated Defects, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; **84**: 3686-3695.

[57] PAN WW, AND MYERS MG. Leptin and the maintenance of elevated body weight, *Nat. Rev. Neurosci.* 2018; **19**: 95-105.

[58] PERROTTA F, NIGRO E, MOLLICA M, COSTIGLIOLA A, D'AGNANO V, DANIELE A, ET AL. Pulmonary Hypertension and Obesity: Focus on Adiponectin, *Int. J. Mol. Sci.* 2019; **20**.

[59] PRUSTY D, PARK BH, DAVIS KE, AND FARMER SR. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, *J. Biol. Chem.* 2002; **277**: 46226-46232.

[60] RITTIG K, HILDEBRANDT U, THAMER C, STAIGER H, PETER A, STEFAN N, ET AL. Apelin serum levels are not associated with early atherosclerosis or fat distribution in young subjects with increased risk for type 2 diabetes, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* 2011; **119**: 358-361.

[61] ROB H. Europe battles with obesity – PubMed, (n.d.).

[62] ROH S, SONG SH, CHOI KC, KATOH K, WITTAMER V, PARMENTIER M, ET AL. Chemerin--a new adipokine that modulates adipogenesis via its own receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; **362**: 1013-1018.

[63] RUAN H, AND DONG LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues, *J. Mol. Cell Biol.* 2016; **8**: 101-109.

[64] SALLES ÉL, KHODADADI H, JARRAHI A, AHLUWALIA M, PAFFARO VA, COSTIGLIOLA V, ET AL. Cannabidiol (CBD) modulation of apelin in acute respiratory distress syndrome, *J. Cell. Mol. Med.* 2020; **24**: 12869-12872.

[65] SAMSON M, EDINGER AL, STORDEUR P, RUCKER J, VERHASSELT V, SHARRON M, ET AL. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains, *Eur. J. Immunol.* 1998; **28**: 1689-1700.

[66] SCHWARTZ MW, PESKIND E, RASKIND M, BOYKO EJ, AND PORTE D. Cerebrospinal fluid leptin levels: Relationship to plasma levels and to adiposity in humans, *Nat. Med.* 1996; **2**: 589-593.

[67] SHEIBANI S, HANACHI P, AND REFAHIAT MA. Effect of Aerobic Exercise on Serum Concentration of Apelin, TNFα and Insulin in Obese Women, *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2012; **15**: 1196-1201.

[68] SOLANTI HEKMAT A, JAVANMARDI K, TAVASSOLI A, AND GHOLAMPOUR Y. Angiotensin (1-7) and Apelin co-therapy: New strategy for heart failure treatment of rats, *Anatol. J. Cardiol.* 2020; **23**: 209-217.

[69] STERN JH, RUTKOWSKI JM, AND SCHERER PE. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis Through Adipose Tissue Crosstalk, *Cell Metab.* 2016; **23**: 770-784.

[70] TAHERI S, MURPHY K, COHEN M, SUJKOVIC E, KENNEDY A, DHILLO W, ET AL. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; **291**: 1208-1212.

[71] TATEMOTO K, HOSOYA M, HABATA Y, FUJII R, KAKEGAWA T, ZOU MX, ET AL. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; **251**: 471-476.

[72] TATEMOTO K, TAKAYAMA K, ZOU MX, KUMAKI I, ZHANG W, KUMANO K, ET AL. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism, *Regul. Pept.* 2001; **99**: 87-92.

[73] TATOŃ J. Historia badań nad otyłością. *Terapia.* 2005.

[74] TUMMINIA A, VINCIGUERRA F, PARISI M, GRAZIANO M, SCIACCA L, BARATTA R, ET AL. Adipose Tissue, Obesity and Adiponectin: Role in Endocrine Cancer Risk, *Int. J. Mol. Sci.* 2019; **20**.
[75] WANG ZV, AND SCHERER PE. Adiponectin, the past two decades, *J. Mol. Cell Biol.* 2016; **8**: 93-100.
[76] WITTAMER V, FRANSSEN JD, VULCANO M, MIRJOLET JF, LE POUL E, MIGEOTTE I, ET AL. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids, *J. Exp. Med.* 2003; **198**: 977-985.
[77] YAMAUCHI T, AND KADOWAKI T. Adiponectin Receptor as a Key Player in Healthy Longevity and Obesity-Related Diseases, *Cell Metab.* 2013; **17**: 185-196.
[78] YANAI H, AND YOSHIDA H. Beneficial Effects of Adiponectin on Glucose and Lipid Metabolism and Atherosclerotic Progression: Mechanisms and Perspectives, *Int. J. Mol. Sci.* 2019; **20**.
[79] ZABEL BA, ALLEN SJ, KULIG P, ALLEN JA, CICHY J, HANDEL TM, ET AL. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades, *J. Biol. Chem.* 2005; **280**: 34661-34666.
[80] ZABEL BA, NAKAE S, ZUNIGA L, KIM JY, OHYAMA T, ALT C, ET AL. Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis, *J. Exp. Med.* 2008; **205**: 2207-2220.
[81] ZABEL BA, SILVERIO AM, AND BUTCHER EC. Chemokine-like receptor 1 expression and chemerin-directed chemotaxis distinguish plasmacytoid from myeloid dendritic cells in human blood, *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2005; **174**: 244-251.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 04.07.2021
Przyjęto: 10.09.2021
Maciej Owecki
Katedra Medycyny Społecznej i Zakład Zdrowia Publicznego
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu
ul. Rokietnicka 4
60-806 Poznań
tel. 61 658 42 75
e-mail: mowecki@ump.edu.pl

PHYTOCHEMISTRY, NUTRITIONAL AND MEDICINAL VALUE OF KIWI FRUIT

Rimsha Bakhtawar RASHEED[1], Shabbir HUSSAIN[1], Shahzada Khurram SYED[2]

[1]Department of Chemistry, Lahore Garrison University, Lahore, Pakistan
[2]Department of Basic Medical Sciences, School of Health Sciences, University of Management and Technology, Lahore, Pakistan

Summary: Current studies were performed to review the phytochemistry, nutritional and medicinal value of kiwi (*Actinidia deliciosa*). Kiwi is one of the richest sources of vitamin C, vitamin E along with folate, phenolic compounds, dietary fibers, and sufficient amount of essential minerals including zinc, copper, potassium so rate as a, highly healthy food. Having immense amount of vitamin C, it is highly recommended for bones and teeth issues, also to heart patients to avoid narrowing of arteries. For having much antioxidant, antitumor and anti-inflammatory properties kiwis are pointed for a promising treatment of catastrophic diseases involving cancer, heart disease, gastrointestinal issues and nervous disorders. For having strontium, biotin and collagen fibers, kiwis are considered an excellent fruit for sleep regulation, for healthy nails, hairs and teeth. However, processing of its extracts may affect the physiochemical and biological properties of kiwifruit derives ingredients. Allergens, mycotoxin, pesticides and heavy metals are the chemical hazards of kiwifruit.

Keywords: kiwi, phytochemicals, nutrients, disease treatment

INTRODUCTION

Kiwifruit (**Fig. 1**) belongs to genus *Actinidia* and its known to all over the world especially due to its health-promoting effects and delicious taste [28]. The fruit has a unique look and flavor along with rich amount of vitamin C [10]. Kiwi got its name from the land of New Zealand. The plant was originated in Chang Kiang valley (Yang Tao) of northern China [11]. It is also called Macaque peach, Mihoutau, and Chinese gooseberry [50]. Kiwi fruit is approximately 3 inches long with a weight of four ounces [63]. There are about 50 types of kiwi fruit, each has different characteristics, frost tolerance, and flavor [30]. Kiwi fruit is also consumed as fresh, as dried and frozen fruit, marmalade, juice, as jam, as jelly and nectar, etc. Its juice is traditionally used as a meat tenderizer in some cultures [21].

FIGURE 1. Kiwi fruit
https://plantinstructions.com/tropical-fruit/how-to-grow-kiwi-in-a-pot/

Kiwi holds its great position in highly nutritious, low-calorie fruits having a potential to deliver great benefits to health [75]. The content of soluble dietary fiber maintain issues of hunger, for having negligible calories it is helpful to lose weight and extra fat from body [60]. The kiwi fruit is also known for its medicinal use in China [27] as it find applications in reduction of irritability, relieving rheumatism, curing of hemorrhoids, prevention of kidney or urinary tract stone, prevention of the premature greying of hairs and also aids in digestion [9].

Current studies were performed to overview the phytochemistry, nutritional and medicinal value of kiwi fruit.

PHYTOCHEMISTRY OF KIWI

The green color of kiwifruit is due to the presence of Chlorophyll [70]. The study of aroma active components and their profile in kiwi fruit are done by Multidimensional Gas Chromatography olfactometry (GC/GC-O) and Gas chromatography- Mass Spectro-photometry (GC-MS) [88]. The chemical composition of kiwifruit in their roots, peel and pulp are discussed below.

PHYTOCHEMICALS IN ROOTS

There are a total twelve compounds (β-Sitosterol, *n*-stearic acid, Iso-scopoletin, Dimethyl chromancarboxylic acid, Fraxetin, Aesculetin, Umbelliferon, Va-

nillic acid, Protocatechuic acid, Vanillic acid 4-*O*-*β*-D-glucopyranoside, 5, 7-dihydroxychromone, Tachioside) that are present in the roots of *Actinidia* [24, 83]:

β-Sitosterol: Its chemical structure is similar to that of cholesterol. It has characteristic odour and are of white waxy powder, one of the components of the food additive E499 and studied for its potential to reduce benign prostatichy perplasia [51], and blood cholesterol levels [77].

***n*-stearic acid**: It has a waxy solid appearance and is mainly used in the production of cosmetics, in detergents, and in soaps, such as shampoos and shaving cream products [1].

Iso-scopoletin: It shows substantial inhibition against the cell proliferation, and multidrug resistant subline and also shows inhibitory activity against HBV replication [55].

Dimethyl chromancarboxylic acid: It used in the preparation of copolymers such as polyamides and polyesters, most widely used in the industry is adipic acid, which is a precursor used in the production of nylons [42].

Fraxetin: It has a role as an Arabidopsis thaliana metabolite, an antimicrobial agent, an apoptosis inhibitor, an apoptosis inducer, an antioxidant, an anti-inflammatory agent, a hepatoprotective agent, an antibacterial agent and a hypoglycemic agent [90].

Aesculetin; Aesculin is used as a vasoprotective agent, and in laboratory to aid in the identification of bacterial species [13].

Umbelliferon: also known as 7-hydroxycoumarin, Umbelliferon is a fluorescing compound used as a sunscreen agent [61].

Vanillic acid: is used as a flavoring agent. It is an oxidized form of vanillin [54].

Protocatechuic acid: (PCA) dihydroxybenzoic acid, type of phenolic acid. It is an antioxidant polyphenol present in the metabolite of green tea. PCA shows particularly mixed effects on both normal and cancer cells [47].

Vanillic acid 4-*O*-*β*-D-glucopyranoside: It is belonging to a compound known as hydrolyzable tannins which is phytotoxic against different species, but not for human but for veterinary use [49].

5, 7-dihydroxychromone: is a natural antioxidant extracted from plants [66].

Tachioside: Tachioside has antioxidant and α-glucosidase inhibitory activities, decreases lipid content in adipocytes by inhibiting lipogenesis, shows antiobesity activities, inhibit nitric oxide production in lipopolysaccharides [24, 83].

PYTOCHEMICALS IN PEEL

The analysis of crude extract from the peel of kiwi led to the isolation of **vitamin E, alpha- and delta-tocopherol** and **2, 8-dimethyl-2- chroman-6-ol,** natural antioxidants that inhibit oxidation of the lipid in biological systems by the stabilization of hydroperoxyl and other free radicals [12]. Tocopherol oil stability in-

creases due to its antioxidant activity [39]. **7 sterols**, **triterpene ursolic acid** and chlorogenic **acid** are the esters of caffeic and quinic acid, act as an intermediate in biosynthesis of lignin, Kiwifruit contains phenolic compounds: flavonoids and anthocyanins.Antioxidant is the primary function of flavonoid. Studies show that in the skin of kiwi there may be more concentration of phenolic compounds [70].

PHYTOCHEMICALS IN PULP

Two caffeic acid **coumarin glucosydes** and **glucosyl derivatives** are isolated by the chemical fraction of pulp crude extract which is used as a flavoring agent profusely in pharmaceutical preparations. Besides the three vitamin E, beta-sit sterol, stigma sterol, and chlorogenic acid , Delta (7) isomer, camp sterol, , and some flavone and its molecules are also present in it [71, 88, 99].

AROMICITY

The aroma in kiwi fresh puree and its aqueous essence are due to of 35 total components contribution which include; methyl-butanol, ethyl furan, cyclohexanone, hexanol, methyl-2-butenal, 3-methyl-2-butanone, 2-methyl-1-butanol, 2,6-nonadienal ,3-methyl 3-buten-2-one, and octane, hexyl hexanoate, ,3-methyl--1-butanol, diethyl succinate, 3-hydroxy-2-butanone ,3-penton-2-ol [44].

Researchers believe that the defense systems may be able to reduce the risk of developing some catastrophic illnesses due to phytochemicals and natural components of plants [70]. These phytochemicals can help to stimulate the enzyme secretion that deactivate carcinogens (cancer-causing chemicals). They also decrease the risk of developing heart and cancer disease.Kiwifruit contains carotenoids: carotenes (primarily beta carotene), Lutein, and xanthophyll's. Diet high in foods containing carotenoids reduced the risk of cancer, heart disease, cataracts, and muscular degeneration [24].

NUTRITIONAL VALUE OF KIWI

Kiwi is highly rich in nutrient contents as shown in **figure 2**. Nutrient percentage of kiwi fruit in per calorie is nearly more than any other fruit. It contains zero sodium, zero cholesterol very less fat along with a heavy amount of dietary fibers, natural sugar, minerals and Vitamins [16]. Vitamins and minerals give perfect nutrition to the body. It maintains balance in the digestive system of body [74]. The important nutritional contents of kiwi fruit are discussed below:

VITAMIN C: In per 100g of fresh weight green cultivars there are typically 80-120mg of vitamins C present [7, 52]. In per 100 g of Sun Gold kiwifruit, it

FIGURE 2. Nutritional value of kiwi
https://www.herbazest.com/herbs/kiwi

contains 161.3mg of Vitamin C which is almost 3 times higher in concentration than in oranges and strawberries [74]. **Figure 3** shows the vitamin C content of kiwi in comparison to other fruits [73, 74].

Deficiency of Vitamin C cause fatigue and lethargy which can be resolved by the supplements of vitamin C [20]. Vitamin C is the cofactor of metalloenzymes necessary for the biosynthesis of neurotransmitters, catecholamine, peptide hormones and collagen-carnitine [3].

VITAMIN E: World widely about 35 000 tons of Vitamin E is manufactured per year, due to its wide applications in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries [89]. It plays very important role in the prevention and treatment of many disorders for the promotion of health. Total of 15 mg (22.4 IU, International Unit) of vitamin E is recommended daily to adults [68]. Compared to other commonly consumed fruits Kiwifruit contains relatively high level of vitamin E [9]. Sun Gold kiwi contain 1.40mg and green contain 1.41mg of vitamin E in per 100g [41], the α-tocopherol is also present in its flesh [13] These are sufficient levels to identify a new form of vitamin E in kiwifruit, δ-tocomonoenol, it's antioxidant

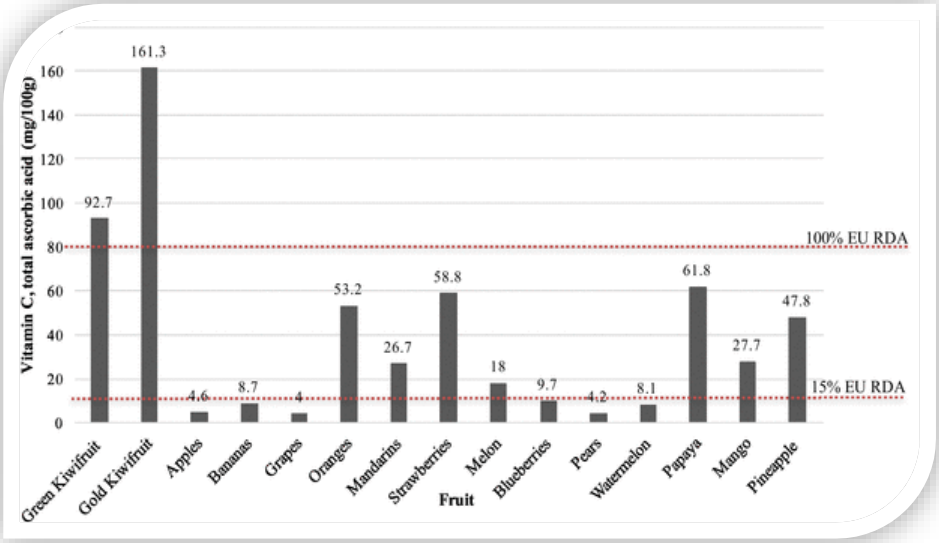


FIGURE 3. Comparing of vitamin C content of kiwi with other fruits [74]

and radical scavenging capacity contributed to the total antioxidant activity of kiwifruit (Fiorentino, et al. 2009). Vitamin E in kiwifruit are bioavailable that correlates with increased plasma of vitamin E concentrations by the consumption of both green and golden kiwifruit [19, 38].

FOLATE: Kiwifruit is a good source of dietary folate. The content of folate in green and golden kiwifruit compared with other commonly consumed fruits are shown in **figure 4**.

The folate in vegetables are easily destroyed by cooking so it is extremely labile compound, during maternity process when it was difficult to meet folate requirements [32] fresh kiwis make a useful contribution in total diet [94].

POTASSIUM: Potassium is a mineral that our body needs each day in relatively higher amount as compared to iron and zinc. The National Academies Institute of Medicine recommends that to buffer the effects of sodium and to promote normal blood pressure levels, in a day healthy adult consume at least 4,700 milligrams of potassium [85]. Intake of kiwifruit and bananas is a very good way to boost potassium. Green and gold kiwifruit contain typically 301-315mg of potassium in per 100g of kiwi. The sodium content of kiwi is only 3mg per 100g and can be described as naturally low in sodium.

According to the recommended value of sodium to potassium (Na+/K+) ratio, kiwifruit is amongst the most favorable balanced Na+/K+ selected fruit and its consumption increase potassium rich diet that can lower blood pressure and

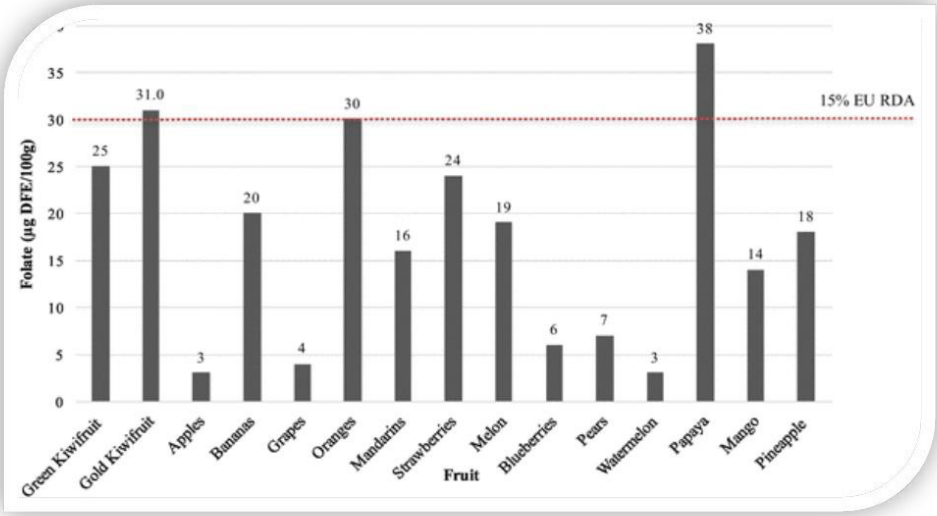


FIGURE 4. Comparing folate content in kiwi and other common fruits [74]

hypertension [80]. Two green kiwis provide 12 percent of daily recommended potassium value, same as banana intake in body [36, 15].

It is evident that consumption of potassium- According to the USDA, golden kiwi is higher in the percentage of potassium than green kiwi [62]. **Figure 5** shows the comparison of potassium content with other fruits [73].

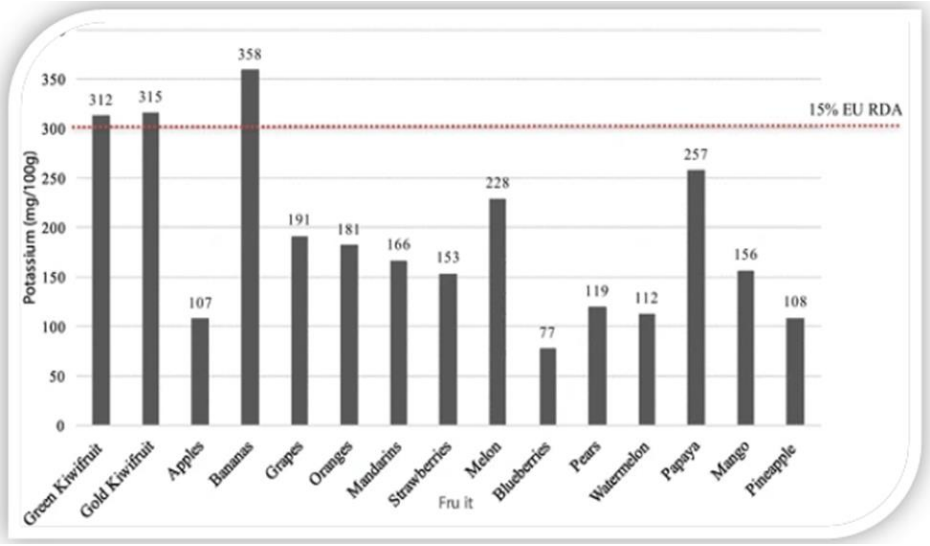


FIGURE 5. Comparing of potassium content in kiwi and in other fruits [74]

DIETARY FIBRE

The cell walls of kiwifruit particularly contain polysaccharides major structural component of these walls, which provide dietary fibers. It contains 2-3% of non-starch polysaccharides [79], that makes the cell wall of fruits, providing both soluble and insoluble fibers to diet [75]. Soluble fiber forms a gel that slows down the emptying process of the stomach contents, it is dissolves in water and comes from the inside of plant cells. Instead, Insoluble fibers add bulk to stool, and keeps it moving through the digestive tract, it doesn't dissolve in water and comes from the walls of plant cells. A single large kiwi fruit contains 1 gram of insoluble fiber and 0.7 gram of soluble fiber [35].

TABLE 1. (Dietary Guidelines for Americans 2015-2020)

NUTRIENTS		AMOUNT IN 1 KIWI (69 G)	DAILY ADULT REQUIREMENT
1	Energy (calories)	42.1	1,600-3,000
2	Carbohydrate(g)	10.1, including 6.2 g of sugar	130
3	Fiber(g)	2.1	22.4-33.6
4	Calcium (mg)	23.5	1,000-1,300
5	Magnesium(mg)	11.7	310-420
6	Beta carotene (mcg	35.9	No data
7	Folate (mg)	17.2	400
8	Vitamin C (mg)	64	65-90
9	Copper (mg)	90	890-900
10	Vitamin E	1.0	15
11	Phosphorus (mg)	23.5	700-1,250
12	Potassium (mg)	215	4,700

CARBOHYDRATE

10 grams of carbohydrate are present in one normal-sized green kiwi. Out of Total 10.1 grams, 6.2 grams of carbohydrate are from naturally occurring sugars and 2.1 gram from fibers. Kiwis are fruit of low glycemic acid with a value of 52 [82].

The **table 1** below shows the amount of specific nutrients in weighing 69g kiwifruit that an adult need per day by the Dietary Guidelines for Americans 2015-2020. where's requirements may vary, depending on person's gender and age [93].

SUGARS

When kiwis are ripened and ready to eat, glucose and fructose are predominant sugars present in it with trace amount of sucrose. Ripening of fruit, leads rapid increase in the concentration of fructose and glucose and decrease in starch concentration. Although the tissues of Kiwifruit are very hard but firmness of flesh decreases at later stages of its development [6].

With the variety and maturity function of kiwifruit the number and ratios of these sugars may vary [64]. The ratio of fructose: glucose should be around 1:1 for digestive health which reduce discomforts of gastrointestinal, such as bloating that caused due to the fermentation in gut. During ripening chlorophyll content is decreased and carotenoids and anthocyanins become dominant. The glycemic response effect of kiwis are potentially different in the management of blood sugar levels [64], relatively low 39.3 ± 4.8 to 48.5 ± 3.1 in green and golden kiwis [78]. Its low GI value is observed in both healthy and in the diabetic patients [56].

MEDICINAL VALUE OF KIWI

A. Chinese's shows a broad range of Pharmacological properties including Anti-tumor, Antioxidant, Anti-inflammatory, Immunoregulatory, Hypolipemic, Anti-diabetic, and Cardiovascular Protective activities, that may possibly be valuable in the prevention and treatment of anthologies associated with cancer, oxidative stress, and aging [34].

Healthful attributes of kiwifruit are high level of ascorbic acid [4, 67], polyphenols, and the presence of flavon [27].

SUPPORT HEART HEALTH

kiwifruit is a heart-healthy superstar. The folate in kiwis are associated with a low risk of blood clots, cardiovascular diseases and stroke [40]. The potassium in it helps to control BP and counteract sodium, relax blood vessels and act as a vasodilator throughout the body. The fiber along with vitamin K found in kiwis are very heart-healthy and able to prevent the buildup of calcium in the arteries that lower the risk of heart attacks [17]. As compared to other fruits, Studies shown that, people who regularly takes kiwifruit have 15 percent lowered value

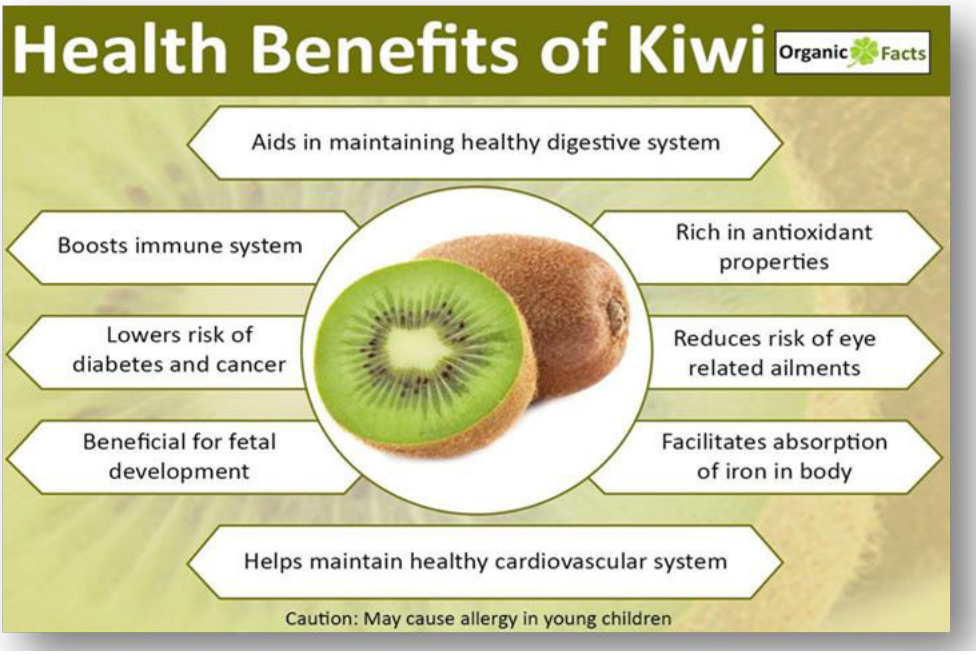


FIGURE 6. Medicinal value of kiwi
https://diabeteswalls.blogspot.com/2019/08/benefits-of-kiwi-for-diabetics.html

of triglycerides level [25]. Kiwifruit is also a great source of vitamin E ,omega--3s [76] magnesium and copper, which helps to keep the cardiovascular function properly, [72, 92] as similar to the daily dose of aspirin [57].

IMPROVE DIGESTIVE HEALTH

Kiwifruit are good source of both soluble and insoluble fibers. Dietary fiber increases bulk of the stool , decreases transit time of the waste, and supports in the healthy gut of bacteria that aid in digestion [18]. **Figure 7** shows the kiwi flavor digestive pills for acidity and healthy bowl function. Actinidia enzyme in kiwi enhances digestion of protein in the small intestines and stomach [26]. Adding two kiwis in patient diet introduces antioxidants and fibers, which results in the production of anti-inflammation so it improve overall bowel function [5, 65].

BOOST IMMUNITY

It is evident that adults associated with low consumption of vitamin C are with increased symptoms of bronchitis and wheezing [4], it is more stronger in asthma and bronchitis susceptible patients . Kiwifruit improve immune function and lower the severity of cold and flu-like illness in older and children [85]. The small kiwi fruit is packed with B6, B12, vitamin C, K, zinc, fiber and folate, and other nutrients all are a powerful immune-boosting punchers [76] .

FIGURE 7. Kiwi flavor digestive pills
https://i3.pureformulas.net/images/product/altImg/large/kiwi-regularity-kiwi-flavor-30-relief--chews-by-enzymedica-extra2.jpg.

GOOD FOR VISION

Kiwis protect from muscular degeneration which is the leading cause of vision loss [8]. Macular degeneration, deterioration of the retina and the age factor are considered the main reasons for vision loss. Retina, macula, is made of lutein and zeaxanthin, 220 mg of zeaxanthin and lutein are present in a cup of kiwi, which rebuild macula and prevent many eye diseases [14, 43, 69].

AID PREVENTION IN IRON DEFICIENCY ANEMIA

Bleeding disorders abnormally increase the amount of blood both from outside and inside leaving your body. Iron deficiency anemia is due to low level of iron in body, which can make you feel tired, weak, and dizzy [46]. A 2004 publication of "American Journal of Clinical Nutrition" evident that taking 63 milligrams of vitamin C rich meal results in non-heme iron that can increase three-fold of overall iron absorption, fresh kiwi fruit contains high amount of vitamin C like pineapple, oranges and peaches [48].

SUPPORT SKIN HEALTH

Collagen is a protein that contributes vastly to skin health by enhancing elasticity, reducing wrinkles, and healing wounds. The vitamin C in kiwi aids in collagen synthesis. Kiwi also contains tocopherol, the major form of vitamin E. **Figure 8** shows the use of kiwi in the flavoring of soap and in cosmetics.

One animal study revealed that topical use of vitamin E reduced acute and chronic damage from UV irradiation, moreover using kiwi externally on your skin may remove the spots of wounds [59].

FIGURE 8. Kiwi flavor soap
https://www.kiwishoponline.com.au/eshop/images/P/Kiwifruit%20Soap%20100g.jpg

PREVENT CHRONIC DISEASE

Many factors can cause oxidative stress, including ozone, certain pesticides, cigarette smoke, radiation, and pollution. Oxidative stress can damage our DNA, leading to several chronic health issues like cancer, heart disease, and diabetes [22]. There is evidence that eating kiwi or kiwi extracts has a protective effect against oxidative stress. Kiwis have antioxidants that makes this all possible [97].

IMPROVE SLEEP

The serotonin in kiwifruit increase efficiency of sleep by 5 to 13 percent. serotonin may also boost memory and helps to reduce depression [8].

HEALTHY FUNCTION OF NERVOUS SYSTEM

Copper is an important mineral for the healthy function of nervous system, but it is present in trace amounts in many foods.

A cup of kiwi contain 20 percent of daily recommended copper amount, which make it an unusually rich source of copper as compared to other fruits [8]. Maintained optimal nervous system improve function of retina part of eye that contained nerves to convert images into electrical impulses for interpretation of brain hence improve eyesight [95].

LOWER BLOOD PRESSURE

Presence of bioactive substances may lower blood pressure (BP) and improve function of endothelial [87]. AS compared to one apple a day ,intake of three kiwis can lower systolic and diastolic level in 24-h in men and women having moderately raised BP [86]. It also shows beneficial effect in platelet aggregation in male smokers [37].

PREVENT BLOOD CLOTING

Blood clotting can cause complications if not discovered and treated at time, adopting an anti-inflammatory diet which is high in omega-3 and vitamin E helps a lot and kiwi Is consider one of the best fruit for preventing blood clotting [87].

PREVENT AGAINST CANCER CELLS

Studies shown that the extract of kiwi fruits provide inhibition against growth of cancer cells [98] and protect cell against oxidative DNA damage [23]. Colo-rectal cancer is cancer of colon (large intestine or rectum), both of these organs are in the lower portion of the digestive system it is cured by taking fruits rich in vitamin C, K, and fiber and kiwi have these vitamins in sufficient. amount [2, 57].

FOR PREGNANT WOMENS

Vitamin C produce collagen- elastic-like material and boosts up immunity that is responsible for the generation of connective tissues in a body that fasten the healing power of pregnant women's. Lack of B9 cause error in baby body called Spina Bifida. Kiwi fruit, for having higher percentage of Folate content provide prevention against such issues [94].

FIGURE 9. Kiwi flavor nail paint remover
http://www.hairproducts.com/images/hp-nai-sup106.jpg

FOR BONES, TEETH AND NAILS

Biotin present in it may help to support nails [45]. **Figure 9** shows the kiwi flavor nail paint remover for healthy nails. Kiwis have fiber content and packed with calcium, which is a super dental mineral, Calcium neutralizes damaging acids, and helps to boost enamel defense [31]. It is an excellent source of Vitamin K hence proves good in the development of stronger bones [33].

ANTIOXIDANTS

Due to the antioxidant chemical profile of Actinidia species it has been extensively studied [81]. Antioxidants includes the carotenoids lutein, caffeic acid glucosyl derivatives, β-sitosterol, quinic acid ,zeaxanthin , β-carotene, chlorophylls, chlorogenic acid, and phenolics, including flavones and flavanones [53].

Various invitro chemical assays monitor the antioxidant capacity of kiwifruit by means of scavenging, retarding , or quenching of free radical generation [84].

For example, the total antioxidant capacity reported in kiwifruit is higher than an apple, pear and grapefruit, but less than strawberry ,raspberry , plum and orange [5]. These in-vitro studies indicate that antioxidants are preventive against delaying of cell damage, from unstable free radicals that are created each day during normal metabolic activities [29, 96]. In general, it has potential to inhibit inflammatory and oxidative processes [58, 91].

CONCLUSIONS

The increased in research data and growing consumer awareness about the health benefits of kiwifruit provide logical motivation for their regular consumption as part of a balanced diet. Having vitamin C, vitamin K and essentials minerals it is good for bones, teeth, hairs and nails. It contains vitamin B3 involved in DNA repair and for skin health Vitamin B12 which supports normal production of blood, Vitamins, B1, B2, and B6 in it helps in the healthy functioning of the nervous system kiwifruit has been shown to accelerate gastric and colonic transit, soften the stools, and to improve constipation. Kiwifruit should be considered as part of a natural and effective dietary strategy to tackle some of the major health and wellness concerns around the world**.** Due to its antioxidant and anti-inflammatory properties it is highly recommended fruit in these days of pandemic where to improve immune system is higher priority.

REFERENCES

[1] ADDITIVES EPOF, FOOD NSAT, MORTENSEN A, AGUILAR F, CREBELLI R, DI DOMENICO A, DUSEMUND B, FRUTOS MJ, GALTIER P, GOTT D, GUNDERT-REMY U. Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. *Efsa journal.* 2017*;* **15**(6): e04786.

[2] ALI R, MIRZA Z, ASHRAF GM, KAMAL MA, ANSARI SA, DAMANHOURI GA, ABUZENADAH AM, CHAUDHARY AG, SHEIKH IA. New anticancer agents: recent developments in tumor therapy. *Anticancer research.* 2012*;* **32**(7): 2999-3005.
[3] ARRIGONI O, DE TULLIO MC. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 2002*;* **1569**(1-3): 1-9.
[4] BARRETT M. (2013). *Over 9 Kiwi Fruit Benefits – Boosting the Immune System, Vision, and Heart Health.* Massey University.
[5] BEEKWILDER J, JONKER H, MEESTERS P, HALL RD, VAN DER MEER IM, RIC DE VOS C. Antioxidants in KIWIS: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005*;* **53**(9): 3313-3320.
[6] BEEVER D. Fruit development and fruit physiology. *Kiwifruit. Science and management.* 1990: 97-126.
[7] BEEVER D, HOPKIRK G, WARRINGTON I, WESTON G. Fruit development and fruit physiology. In 'Kiwifruit: science and management'. *Ray Richards, Auckland.* 1990: 97-126.
[8] BIGGERS A, HENKINS J, BARTON I, HUBBARD C, PEREZ R, SHARP LK, GERBER BS. Feasibility of Text Message Sleep Assessment in African Americans and Latinos with Type 2 Diabetes. *Journal of Clinical Sleep Medicine.* 2020: jcsm. 8828.
[9] BOLAND M, MOUGHAN PJ. (2013). *Nutritional benefits of kiwifruit*: Academic Press.
[10] BOLAND MJ, RAE AN, VEREIJKEN JM, MEUWISSEN MP, FISCHER AR, VAN BOEKEL MA, RUTHERFURD SM, GRUPPEN H, MOUGHAN PJ, HENDRIKS WH. The future supply of animal-derived protein for human consumption. *Trends in Food Science & Technology.* 2013*;* **29**(1): 62-73.
[11] BOWLING BL. (2000). *berry grower's companion*: Timber Press.
[12] BRAMLEY PM. Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry.* 2000*;* **54**(3): 233-236.
[13] BRISTOL. esculin. *drugs.com.* 2016*;* **115**(1).
[14] CALVO MM. Lutein: a valuable ingredient of fruit and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2005*;* **45**(7-8): 671-696.
[15] CAMBELL M. Which Has the Higher Amount of Potassium, Kiwis or Bananas? *healthy eating* 2007*;* **6838**(2): 92-119.
[16] CERVIONA B. nutritional food. *The Berry Grower's Companion.* 2020*;* **97**(9): 629.
[17] CERVONI B. The Health Benefits of kiwifruit. *Verywellhealth. Last modified January.* 2020*;* **18**(2020.
[18] CHANG C-C, LIN Y-T, LU Y-T, LIU Y-S, LIU J-F. Kiwifruit improves bowel function in patients with irritable bowel syndrome with constipation. *Asia Pacific journal of clinical nutrition.* 2010*;* **19**(4): 451.
[19] CHANG W-H, LIU J-F. Effects of kiwifruit consumption on serum lipid profiles and antioxidative status in hyperlipidemic subjects. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 2009*;* **60**(8): 709-716.
[20] CHERASKIN E, RINGSDORF JR W, MEDFORD F. Daily vitamin C consumption and fatigability. *Journal of the American Geriatrics Society.* 1976*;* **24**(3): 136-137.
[21] CHRISTENSEN M, TØRNGREN M, GUNVIG A, ROZLOSNIK N, LAMETSCH R, KARLSSON A, ERTBJERG P. Injection of marinade with actinidin increases tenderness of porcine M. biceps femoris and affects myofibrils and connective tissue. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2009*;* **89**(1607-1614. doi:10.1002/jsfa.3633
[22] COLLINS AR. (2013). Kiwifruit as a modulator of DNA damage and DNA repair *Advances in food and nutrition research* (Vol. 68, pp. 283-299): Elsevier.
[23] COLLINS BH, HORSKÁ A, HOTTEN PM, RIDDOCH C, COLLINS AR. Kiwifruit protects against oxidative DNA damage in human cells and in vitro. *Nutrition and cancer.* 2001*;* **39**(1): 148-153.
[24] COSSA G, TROVA C, GANDOLFO G. [Extraction and identification of kiwi fruit volatile constituents].[Italian]. *Industrie Alimentari.* 1988.
[25] DUTTAROY AK, JØRGENSEN A. Effects of kiwi fruit consumption on platelet aggregation and plasma lipids in healthy human volunteers. *Platelets.* 2004*;* **15**(5): 287-292.
[26] EDMUNDS SJ, ROY NC, LOVE DR, LAING WA. Kiwifruit extracts inhibit cytokine production by lipopolysaccharide-activated macrophages, and intestinal epithelial cells isolated from IL10 gene deficient mice. *Cellular immunology.* 2011*;* **270**(1): 70-79.

[27] FERGUSON A, BOLLARD E. Domestication of the kiwifruit. *Kiwifruit: science and management.* 1990: 165-246.
[28] FERGUSON A, FERGUSON L. (2002). *Are kiwifruit really good for you?* Paper presented at the V International Symposium on Kiwifruit 610.
[29] FYMAT AL. Antiangiogenic targeting of early developing glioblastoma behind a weakened blood brain barrier. *Journal of Anti-Tumor Medicine and Prevention.* 2017*;* **2**(3): 1-6.
[30] GRANT BL. (2018). *kiwi fruit* (0043-2296). Retrieved from
[31] GRAZIANI F, DISCEPOLI N, GENNAI S, KARAPETSA D, NISI M, BIANCHI L, ROSEMA NAM, VAN DER VELDEN U. The effect of twice daily kiwifruit consumption on periodontal and systemic conditions before and after treatment: A randomized clinical trial. *Journal of periodontology.* 2018*;* **89**(3): 285-293.
[32] GREENBERG JA, BELL SJ, GUAN Y, YU Y-H. Folic acid supplementation and pregnancy: more than just neural tube defect prevention. *Reviews in Obstetrics and Gynecology.* 2011*;* **4**(2): 52.
[33] HAMIDI MS, GAJIC-VELJANOSKI O, CHEUNG AM. Vitamin K and bone health. *Journal of clinical densitometry.* 2013*;* **16**(4): 409-413.
[34] HE X, FANG J, CHEN X, ZHAO Z, LI Y, MENG Y, HUANG L. Actinidia chinensis Planch.: A review of chemistry and pharmacology. *Frontiers in pharmacology.* 2019*;* **10**(
[35] HODJAT M, KHALID M, ASGHARI M, ATRI S, RAHIMIFARD M, NEJAD SM, BAEERI M. (2020). Nutrients and Nutraceuticals in Aging *Nutrients and Nutraceuticals for Active & Healthy Ageing* (pp. 63-109): Springer.
[36] HUANG Y-H, KUO H-C, HUANG F-C, YU H-R, HSIEH K-S, YANG Y-L, SHEEN J-M, LI S-C, KUO H-C. Hepcidin-induced iron deficiency is related to transient anemia and hypoferremia in Kawasaki disease patients. *International journal of molecular sciences.* 2016*;* **17**(5): 715.
[37] HUNTER DC, SKINNER MA, FERGUSON AR. (2016). Kiwifruit and health *Fruits, Vegetables, and Herbs* (pp. 239-269): Elsevier.
[38] HUNTER DC, SKINNER MA, WOLBER FM, BOOTH CL, LOH JM, WOHLERS M, STEVENSON LM, KRUGER MC. Consumption of gold kiwifruit reduces severity and duration of selected upper respiratory tract infection symptoms and increases plasma vitamin C concentration in healthy older adults. *British Journal of Nutrition.* 2012*;* **108**(7): 1235-1245.
[39] IZQUIERDO N, MASCIOLI S, AGUIRREZÁBAL L, NOLASCO S. Temperature influence during seed filling on tocopherol concentration in a traditional sunflower hybrid. *Grasas y Aceites.* 2007*;* **58**(2): 170-178.
[40] JULIE CORLISS. Folic acid, a B vitamin, lowers stroke risk in people with high blood pressure. *Harvard Health Publishing, Harvard Medical School.* 2015*;* **18**(1): 8-17.
[41] JIA J, MOORE LL, CABRAL H, HANCHATE A, LAROCHELLE MR. Changes to dietary and health outcomes following implementation of the 2012 updated US Department of Agriculture school nutrition standards: Analysis using National Health and Nutrition Examination Survey, 2005-2016. *Public Health Nutrition.* 2020*;* **23**(16): 3016-3024.
[42] JIANG Y, LOOS K. Enzymatic synthesis of biobased polyesters and polyamides. *Polymers.* 2016*;* **8**(7): 243.
[43] JOHNSON EJ. The role of carotenoids in human health. *Nutrition in clinical care.* 2002*;* **5**(2): 56-65.
[44] JORDAN MJ, MARGARIA CA, SHAW PE, GOODNER KL. Aroma active components in aqueous kiwi fruit essence and kiwi fruit puree by GC-MS and multidimensional GC/GC-O. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2002*;* **50**(19): 5386-5390.
[45] KABONGO ML. A Colour Atlas of the Nail in Clinical Diagnosis. *Archives of Family Medicine.* 1994*;* **3**(6): 558.
[46] KAHN A. Prevention from blood clotting '(Gold3) kiwifruit. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science.* 2018*;* **46**(2): 133-143.
[47] KAKKAR S, BAIS S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *International Scholarly Research Notices.* 2014*;* **2014**(

[48] KERNS M. Food rich in vitamin C 2018.
[49] KHADEM S, MARLES RJ. Monocyclic phenolic acids; hydroxy-and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies. *Molecules.* 2010*;* **15**(11): 7985-8005.
[50] KHALUA RK, SAHU RS, SINGH K, TEWARI S. Kiwifruit and its Medicinal Properties: A Review. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology.* 2020*;* **12**(5): 26-30.
[51] KIM T-H, LIM H-J, KIM M-S, LEE MS. Dietary supplements for benign prostatic hyperplasia: An overview of systematic reviews. *Maturitas.* 2012*;* **73**(3): 180-185.
[52] LABARTHE DR, BIGGERS A, GOFF JR DC, HOUSTON M. Translating a plan into action: a public health action plan to prevent heart disease and stroke. *American journal of preventive medicine.* 2005*;* **29**(5): 146-151.
[53] LEONTOWICZ H, LEONTOWICZ M, LATOCHA P, JESION I, PARK Y-S, KATRICH E, BARASCH D, NEMIROVSKI A, GORINSTEIN S. Bioactivity and nutritional properties of hardy kiwi fruit Actinidia arguta in comparison with Actinidia deliciosa 'Hayward'and Actinidia eriantha 'Bidan'. *Food chemistry.* 2016*;* **196**(281-291.
[54] LESAGE-MEESSEN L, DELATTRE M, HAON M, THIBAULT J-F, CECCALDI BC, BRUNERIE P, ASTHER M. A two-step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining Aspergillus niger and Pycnoporus cinnabarinus. *Journal of biotechnology.* 1996*;* **50**(2-3): 107-113.
[55] LI H, ZHOU CX, PAN Y, GAO X, WU X, BAI H, ZHOU L, CHEN Z, ZHANG S, SHI S. Evaluation of antiviral activity of compounds isolated from Ranunculus sieboldii and Ranunculus sceleratus. *Planta medica.* 2005*;* **71**(12): 1128-1133.
[56] LIN H-H, TSAI P-S, FANG S-C, LIU J-F. Effect of kiwifruit consumption on sleep quality in adults with sleep problems. *Asia Pacific journal of clinical nutrition.* 2011*;* **20**(2): 169.
[57] LIPPI G, MATTIUZZI C. Kiwifruit and Cancer: An Overview of Biological Evidence. *Nutrition and Cancer.* 2020*;* **72**(4): 547-553.
[58] LUECKING C. Academy of Nutrition and Dietetics Foundation Scholarship Recipients for 2015-2016. 2015.
[59] MANACH C, SCALBERT A, MORAND C, RÉMÉSY C, JIMÉNEZ L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition.* 2004*;* **79**(5): 727-747.
[60] MARTIN H, CORDINER SB, MCGHIE TK. Kiwifruit actinidin digests salivary amylase but not gastric lipase. *Food & function.* 2017*;* **8**(9): 3339-3345.
[61] MAZIMBA O. Umbelliferone: Sources, chemistry and bioactivities review. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University.* 2017*;* **55**(2): 223-232.
[62] MCCRORY MA. (2018). *Dietary Fibers and Human Health*: MDPI.
[63] MILLIGAN G. nutritional value of kiwi fruit. *oxford university.* 2001: 178-202.
[64] MISHRA S, EDWARDS H, HEDDERLEY D, PODD J, MONRO J. Kiwifruit non-sugar components reduce glycaemic response to co-ingested cereal in humans. *Nutrients.* 2017*;* **9**(11): 1195.
[65] NATALIE BUTLER RD, L.D Benefits of kiwi in digestion *AIMS Public Health.* 2018*;* **5**(4): 394.
[66] Neuroprotection against 6-OHDA-induced oxidative stress and apoptosis in SH-SY5Y cells by 5, 7-Dihydroxychromone: Activation of the Nrf2/ARE pathway. *Life sciences.* 2015*;* **130**(25-30.
[67] NIEUWENHUIZEN NJ, BEUNING LL, SUTHERLAND PW, SHARMA NN, COONEY JM, BIELESKI LR, SCHRÖDER R, MACRAE EA, ATKINSON RG. Identification and characterisation of acidic and novel basic forms of actinidin, the highly abundant cysteine protease from kiwifruit. *Functional Plant Biology.* 2007*;* **34**(10): 946-961.
[68] NIKI E, ABE K. Vitamin E: Structure, properties and functions. 2019.
[69] NISHIYAMA I, FUKUDA T, OOTA T. Genotypic differences in chlorophyll, lutein, and β-carotene contents in the fruits of Actinidia species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005*;* **53**(16): 6403-6407.
[70] PEARSON WS, CHERRY DK, LEICHLITER JS, BACHMANN LH, CUMMINGS NA, HOGBEN M. Availability of Injectable Antimicrobial Drugs for Gonorrhea and Syphilis, United States, 2016. 2019.

[71] PERERA P, PENG C, XUE L, LI Y, FANG W. Han C. Effects of Yi Shen Juan Bi (YJB) pill on Experimental Rheumatoid Arthritis. Chinese Journal of Natural Medicines 8, 57-61. 2010.

[72] RECIO-RODRIGUEZ JI, GOMEZ-MARCOS MA, PATINO-ALONSO MC, PUIGDOMENECH E, NOTARIO-PACHECO B, MENDIZABAL-GALLASTEGUI N, OTEGUI-ILARDUYA L, MADE-RUELO-FERNANDEZ JA, DE CABO LASO A, AGUDO-CONDE C. Effects of kiwi consumption on plasma lipids, fibrinogen and insulin resistance in the context of a normal diet. *Nutrition journal.* 2015*;* **14**(1): 97.

[73] RICHARDSON DP. Developing the right public health strategies for folic acid and reduction of risk of neural tube defects (NTDs) in the United Kingdom. *European Journal of Nutrition & Food Safety.* 2015: 242-249.

[74] RICHARDSON DP, ANSELL J, DRUMMOND LN. The nutritional and health attributes of kiwifruit: a review. *European journal of nutrition.* 2018*;* **57**(8): 2659-2676.

[75] RICHARDSON DP, EGGERSDORFER M. Opportunities for product innovation using authorised E uropean U nion health claims. *International Journal of Food Science & Technology.* 2015*;* **50**(1): 3-12.

[76] RICHTER A. folate contant in kiwi. *cherries benefits in health* 2020.

[77] RUDKOWSKA I, ABUMWEIS SS, NICOLLE C, JONES PJ. Cholesterol-lowering efficacy of plant sterols in low-fat yogurt consumed as a snack or with a meal. *Journal of the American College of Nutrition.* 2008*;* **27**(5): 588-595.

[78] RUSH E, DRUMMOND L. The glycaemic index of kiwifruit. *NZ Kiwifruit J.* 2009*;* **192**(May/June): 29-33.

[79] RUSH E, FERGUSON LR, CUMIN M, THAKUR V, KARUNASINGHE N, PLANK L. Kiwifruit consumption reduces DNA fragility: a randomized controlled pilot study in volunteers. *Nutrition Research.* 2006*;* **26**(5): 197-201.

[80] RUST P, EKMEKCIOGLU C. (2016). Impact of salt intake on the pathogenesis and treatment of hypertension *Hypertension: from basic research to clinical practice* (pp. 61-84): Springer.

[81] SAMOTICHA J, WOJDYŁO A, GOLIS T. Phenolic composition, physicochemical properties and antioxidant activity of interspecific hybrids of grapes growing in Poland. *Food chemistry.* 2017*;* **215**(263-273.

[82] SCHWINGSHACKL L, HOFFMANN G. Long-term effects of low glycemic index/load vs. high glycemic index/load diets on parameters of obesity and obesity-associated risks: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* 2013*;* **23**(8): 699-706.

[83] SHASTRI KV, BHATIA V, PARIKH PR, CHAPHEKAR VN. Actinidia deliciosa: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.* 2012*;* **3**(10): 3543.

[84] SINGLETARY K. Kiwifruit: overview of potential health benefits. *Nutrition Today.* 2012*;* **47**(3): 133-147.

[85] STONEHOUSE W, GAMMON CS, BECK KL, CONLON CA, VON HURST PR, KRUGER R. Kiwifruit: our daily prescription for health. *Canadian journal of physiology and pharmacology.* 2013*;* **91**(6): 442-447.

[86] SVENDSEN M, KLEMSDAL TO, HEGGEN E, HOLME I, PEDERSEN TR, SELJEFLOT I, BLOMHOFF R, TONSTAD S. (2011). Effect of Dietary Intake of Kiwi Fruit on 24-Hour Ambulatory Blood Pressure: Am Heart Assoc.

[87] SVENDSEN M, TONSTAD S, HEGGEN E, PEDERSEN TR, SELJEFLOT I, BØHN SK, BASTANI NE, BLOMHOFF R, HOLME IM, KLEMSDAL TO. The effect of kiwifruit consumption on blood pressure in subjects with moderately elevated blood pressure: a randomized, controlled study. *Blood pressure.* 2015*;* **24**(1): 48-54.

[88] TAKEOKA GR, GUNTERT M, FLATH RA, WURZ RE, JENNINGS W. Volatile constituents of kiwi fruit (Actinidia chinensis Planch.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1986*;* **34**(3): 576-578.

[89] THOMAS N. Synthesis of vitamin E. *Litwack, Gerald. Vitamin E. Vitamins & Hormones.* 2007*;* **76**(155-202.
[90] THUONG PT, POKHAREL YR, LEE MY, KIM SK, BAE K, SU ND, OH WK, KANG KW. Dual anti-oxidative effects of fraxetin isolated from Fraxinus rhinchophylla. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2009*;* **32**(9): 1527-1532.
[91] TYAGI S, NANHER A, KUMAR V, NISHAD S, AHMAD M, BHAMINI K. Kiwifruit: Health benefits and medicinal importance. *Rashtriya krishi.* 2015*;* **10**(2): 98-100.
[92] WANG J, VANGA SK, RAGHAVAN V. Structural responses of kiwifruit allergen Act d 2 to thermal and electric field stresses based on molecular dynamics simulations and experiments. *Food & Function.* 2020*;* **11**(2): 1373-1384.
[93] WARE M. International Journal of Molecular Biology and Biochemistry OF FRUITES. *Food and Nutrition Science.* 2019.
[94] WILLERS S, DEVEREUX G, CRAIG L, MCNEILL G, WIJGA A, ABOU EL-MAGD W, TURNER S, HELMS P, SEATON A. Maternal food consumption during pregnancy and asthma, respiratory and atopic symptoms in 5-year-old children. *Thorax.* 2007*;* **62**(9): 773-779.
[95] WILLIAMS HA, JONES MH, NEJATI M, SEABRIGHT MJ, BELL J, PENHALL ND, BARNETT JJ, DUKE MD, SCARFE AJ, AHN HS. Robotic kiwifruit harvesting using machine vision, convolutional neural networks, and robotic arms. *biosystems engineering.* 2019*;* **181**(140-156.
[96] WILSON DW, NASH P, BUTTAR HS, GRIFFITHS K, SINGH R, DE MEESTER F, HORIUCHI R, TAKAHASHI T. The role of food antioxidants, benefits of functional foods, and influence of feeding habits on the health of the older person: an overview. *Antioxidants.* 2017*;* **6**(4): 81.
[97] XU X, DENG J, LUO D, BAO Y, LIAO X, GAO H, WU J. Comparative study of high hydrostatic pressure and high temperature short time processing on quality of clear and cloudy Se-enriched kiwifruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies.* 2018*;* **49**(1-12.
[98] YOU Y, JIANG Y, SUN J, LIU H, SONG L, DUAN X. Effects of short-term anoxia treatment on browning of fresh-cut Chinese water chestnut in relation to antioxidant activity. *Food Chemistry.* 2012*;* **132**(3): 1191-1196.
[99] YOUNG H, STEC M, PATERSON VJ, MCMATH K, BALL R. (1995). Volatile compounds affecting kiwifruit flavor: ACS Publications.

Editor – Michał Nowicki

Received: 22.05.2021
Accepted: 13.07.2021
Shabbir Hussain
e-mail: dr.shabbirhussain@lgu.edu.pk, shabchem786@gmail.com
mob # +92-3214140130

PHYTOCHEMISTRY, NUTRITIONAL AND MEDICINAL IMPORTANCE OF ALMOND

Ayesha SIDDIQUA[1], Shabbir HUSSAIN[1], Shahzada Khurram SYED[2]

[1]Department of Chemistry, Lahore Garrison University, Lahore, Pakistan
[2]Department of Basic Medical Sciences, School of Health Sciences, University of Management and Technology, Lahore, Pakistan

Summary: Almond belongs to the Rosaceae family commonly known as Prunus dulcis. Almond kernel extract contains phytochemicals as well as fatty acids, phenolic acids, phenolic compounds, flavonoids, phytosterols and vitamins. The major fatty acids were linoleic acid (15.43%) and oleic acid (76.23%). These outcomes show that almond extraction is a rich source of fatty acids, soluble lipid vitamins, phytosterols, flavonoids, phenolic compounds. Moreover, these results are important in the science of nutrition, because these chemicals seem to have a significant health effect. Almond kernel has high nutritional value, these days, they are in required as a nutritious food with progressive growth in population. Research on a composition of almond micro- and macronutrients has shown that nuts contain many nutritious components like lipids, amino acids, carbohydrates, minerals, vitamins, proteins, and secondary metabolites. Clinical studies have confirmed the effects of almond kernel on fatty acid variation, protective effects of diabetes, role of weight control, metabolic syndrome and cardiovascular disease. The current review is designed to highlight the significance of almonds kernel as a nutritious food source, as well as to explore factors that contribute to the quality of almond seed.

Keywords: almond, phytochemicals, nutrients, disease treatment

INTRODUCTION

The kernel of the almond plant is termed as Prunus dulcis, a member of a family Rosaceae with genus Prunus L., cultivated in Mediterranean climate, including the Australia, central Asia, and California (United States) Mediterranean, native to south-central Asia [55]. Almond kernels contain diverse amount of amygdalin, diglucoside reduced to benzaldehyde and hydrogen cyanide in response to crushing of kernel and exposure to water or saliva [54]. Cultivated almonds varieties grown show a distinct chemical profile because of environmental portion, genetic portion, and processing conditions. Up taking of almond nut regularly

has always been linked to beneficial outcomes, mainly in cardiometabolic disorder [14].Clinical trials and epidemiological studies have reported benefical influence of nut use compared to a specific number of pathalogies such as high blood pressure, diabetes, obesity and metabolic syndrome [5, 47]. Prunus amygdalus L. comprises of carbohydrates, protein, calcium, fats, iron, phosphorus, oxalic acid, thiamine, sulphur, copper, iodine, and chlorine [1]. Almond is considered a potent source of tocopherols (vitamin E), lipids (monounsaturated and polyunsaturated) and arginine [45]. All forms of almond are being used by consumers. They are mostly consumed as snacks and are used in making variety of sweets and spicy dishes. Techniques used for almond's processing include: roasting, blanching, particle size reduction and oil extraction. Roasting is a heating process which cause dehydration of almond [23]. Blanching is done to reduce contamination caused by microbial growth. These thermal techniques used dry and wet method to remove skin of almond. Blanching reduce the nutritional quality of almonds because it involve removal of skin which contain essential phenolic constituents and flavonoids. Moisture content of blanched almond is higher, when compared to roasted almond. Roasted and blanched almond can be processed further to reduce their shape and size. After that other methods involving solvent extraction (SE) and supercritical fluid extraction (SCFE) are being used for the extraction of almond oil [53]

Dry matter content of fresh almond seed is relatively higher that is around 97 to 98 percent and is mainly composed of carbohydrates, protein, fiber, ash, mineral etc. Because of low starch and high protein content, it can be incorporated into cookies and cake for diabetic patient [46]. In addition, it is a rich source of essential minerals, vitamin E, dietary fiber, mono-unsaturated fats, vitamins B and phytosterols containing cholesterol lowering substances. They are also useful in treating various skin diseases such as eczema and acne [40].

FIGURE 1. Almond Seeds on Plant
https://4.imimg.com/data4/HS/WH/MY-1238623/almond-plant-500x500.jpg

PHYTOCHEMISTRY

The seed of the almond tree is 3-5.5 cm wide and 5-7 cm in length, green at first, then yellow and finally red when ripe. The fruit contain a single seed, which is a tasty edible snack eaten by children and snacks and there have been no reports of toxicity associated with its use [36]. It is also a fruit with a thick grey and green outer shell called a hull. It has been shown to be a nutritious food that provides more than 20% of the daily amount of niacin, calcium, vitamin E, riboflavin, magnesium, iron, phosphorus, manganese, and zinc per 100 g each [7]. The group of Almond is comprised of two varieties, namely Prunus Amara (bitter almond) and Prunus dulcis (sweet almonds). Almond oil is obtained mainly from sweet almonds, which contain about 50% oil. This extraction is made commercially by solvent extraction and cold press [50].

Almond plants are major resource of essential antioxidants that include vitamin C, tocopherols, phenolic compounds and carotenoids. These chemical was developed as suitable compound in case of oxidative stress due to their high degradation function [49].

Although free radicals and other forms of oxygen is persistently produced in the human body, the imbalance between antioxidants and oxidants, yields oxidants, which is related to oxidative stress and is involved in a few human disorders. Considering their functioning properties, natural antioxidants are promoted as molecules that expand the timeframe of realistic usability of items in the food business. Natural antioxidants are used for this purpose instead of synthetic antioxidants (for example butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene). **Figure 3** shows the bioactive chemical in kernel and its by-products [4, 6, 39, 43].

FIGURE 2. Parts of Almond fruit
https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.mdpi.com%2F1420-3049%2F22%2F10%2F1774%2Fhtm&psig=AOvVaw21Q6trpH4R24StbP_1GejP&ust=1610047808563000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCNiRhpa0ie4CFQAAAAAdAAAAABAJ

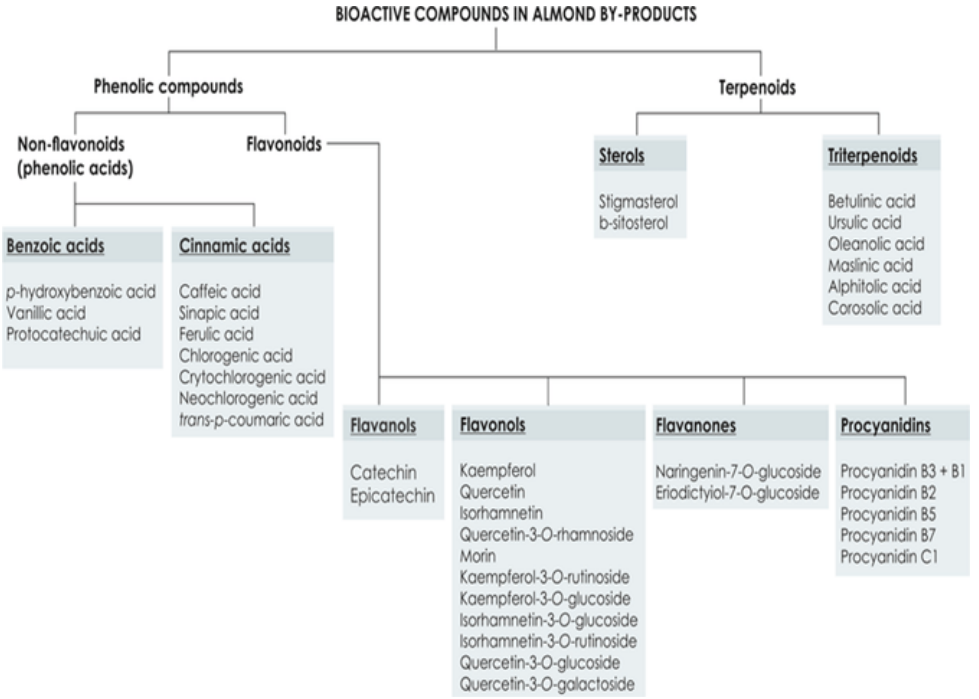


FIGURE 3. Bioactive chemicals in almond by-products
https://www.researchgate.net/publication/320562479/figure/fig2/AS:552618563178496@1508765940206/Bioactive-compounds-in-almond-by-products-Bioactive-compounds-in-almond-by-products.png

PHENOLIC COMPOUNDS

A phenolic compound is a large group of phytochemicals in Prunus dulcis. The class of chemical compounds consisting of one or more hydroxyl groups bonded directly to an aromatic ring, and categorize as flavonoid and non-flavonoid chemicals. The flavonoids class is made up of aurones (4a), flavones (4b), flavanones (4c), flavanols (4d), flavonols (4e), anthocyanins (4f), and chalcones (4g), and the non-flavonoids (phenolic acids) mainly include benzoic and cinnamic acids (5a and 5b, respectively) [15, 22].

FLAVONOIDS

Flavonoids are pigments which are soluble in water, consists of two phenyl rings that are joined by three carbon atoms forming oxygen containing heterocyclic compound [35]. These phenolic compounds are synthesized in the form of phenylpropanoid, in which 4-coumaroyl-coenzyme A is formed by phenylalanine,

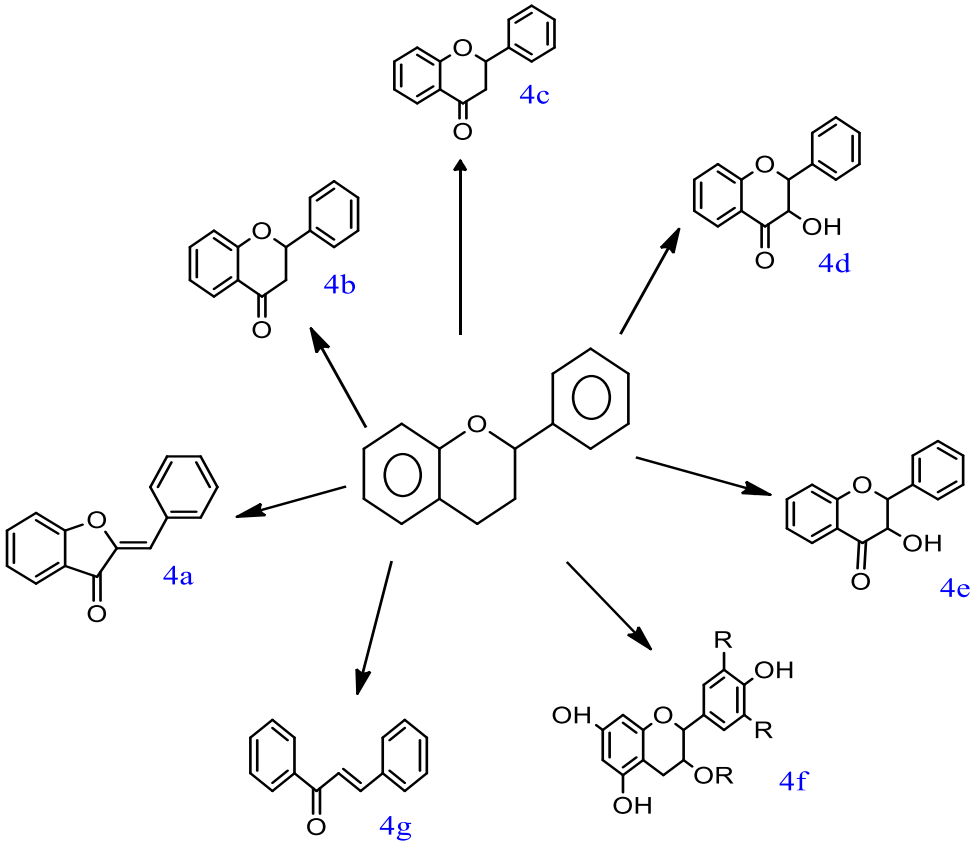


FIGURE 4. Structure of flavonoids class

and then enters the flavonoid in biogenesis pathway. The biological functions of flavonoids in plants are related to protection against UV rays, bacterial infections, pollination nodulation [17], flower pigmentation and symbiotic nitrogen fixation, act as chemical agents, regulators and cell cycle inhibitors [26]. In almond tree, flavonoids are in a form of glycosides and aglycones [20]. The formation of flavonoids in plants is affect by many factors like UV radiations, environmental conditions, geographical origin, pest and disease exposure, agricultural practices, storage, processing and maturation stage [38].

PHENOLIC ACIDS

Phenolic acid is the second metabolite characterized by aromatic hydroxylated rings. Hydroxycinnamic acids and hydroxybenzoic are manufacture by shikimic acid in the normal phenylpropanoid form. However, apart from the lengthy study of the chemical and biological functions of phenolic acid, to date, these data are

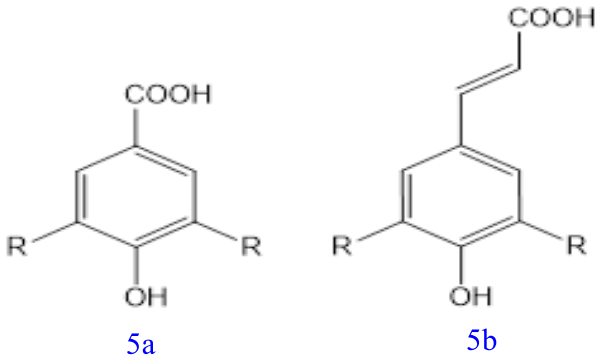


FIGURE 5. Structure of non-flavonoids class

still lacking, and there are limitations to their ability to measure biological activity in trees. However, the biological purpose of phenolic acid is associated with nutrient uptake, protein synthesis and photosynthesis [41].

NUTRITIONAL IMPORTANCE

The plant continues to transform the face of the earth with the unique benefits they offer around the world. Almond seeds form an important part of the human food and their importance, especially in the diet of the developing world, is increasing for a number of reasons [3]. Almond seeds are an excellent source of edible oils, fats and protein in foods and immature industries in local industries. The seeds are also used by many rural residents in South Nigeria to supplement local food, which is often low in protein [13].

ALMONDS AS A SOURCE OF ENERGY AND MACRONUTRIENTS

Almonds typically contain around 575 kcal per 100 g and about 50% fat. However, the lipid compositions of almonds are beneficial because monounsaturated fatty acids (MUFA) are high and the saturated fat content (3.7 g per 100 g almonds) is lower than all nuts. Total fat contains 62% MUFA and 24% polyunsaturated fatty acids [12, 42, 52]. Fatty acids from almonds plays an important role to the health benefits of regular nut use, namely reduced risk of sudden cardiac death, heart disease, lowering blood cholesterol, preservation or strengthening of low density lipoprotein (LDL) resistance to chemicals and improving the function of endothelial [21, 42]. In almond the whole protein content is 21.2%, making them a rich source of plant protein, and the proteins in almonds are high in arginine [2]. Almond kernel contain approximately 3.9 g of whole sugar per 100 g, and

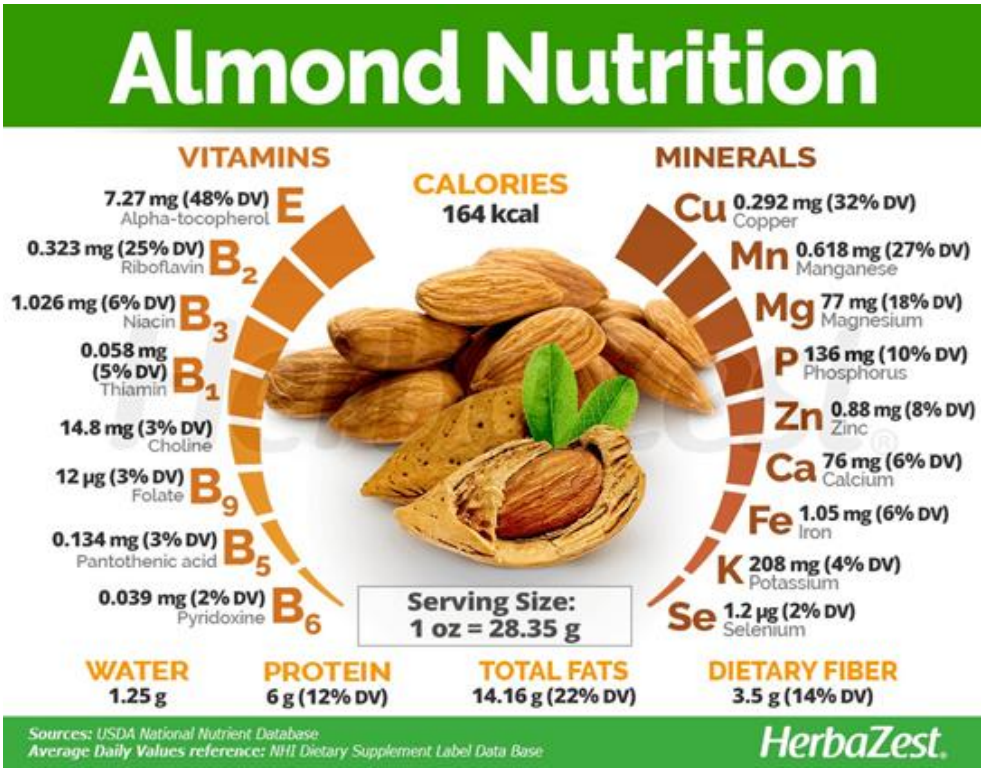


FIGURE 6. Almond nutrition

because they contain less than 5 g sugar per 100 g can be described as 'naturally low sugar' under the new European regulation on Nutrition 1924/2006 regarding food requests and health [33].

The quantity of nutrients in almonds relies on the origin and variety. Additionally to many amino acids and fats, bitter almonds contain minerals, such as Zn, Ca, Mg, Zn, Fe, K, and vitamins, especially vitamin E [32]. The Bitter almond kernel contains about 60% carbohydrates, 30% protein, 3% amygdalin, 48% fat, and other nutrients [10]. Moreover, according to a study on the bitter almond properties, the almond kernel contains 94.84% of its unrefined oil and 49.6% fat. Moreover, the seed was found to contain 26.72% amino acids (17 total amino acids), 7.57% essential amino acids and 27% protein [31]. The lipid of the almond seed are linoleic acid (20.68%) and oleic acid (70.61%). Almond seed acid is an important source of vitamin K (42.25 mg/kg), lipid-soluble vitamins [vitamin D (1.40 mg/kg), fatty acids (92.15 mg/kg) and saturated fatty acids (7.85 mg/kg) [28]. Bitter almond has a huge quantity of supplements [29].

TABLE 1. Nutrients and mineral composition

NUTRIENTS	VALUE PER 100 G WHOLE ALMOND	UNIT	MINERALS	VALUE PER 100 G WHOLE ALMOND	UNIT
Calories	579	Kcal	Calcium	269	mg
Water	4.41	g	Iron	3.71	mg
Protein	21.15	g	Magnesium	270	mg
Lipids	49.93	g	Phosphorus	481	mg
Dietary fiber	12.5	g	Potassium	733	mg
Sugar	4.35	g	Sodium	1	mg
Ash	2.97	g	Zinc	3.12	mg
			Copper	1.03	mg
			Manganese	2.18	mg

FIGURE 7. Almond nutrition facts
https://www.verywellfit.com/thmb/KDbn_xuT8jovy767LHD1Cecs0c=/1500x1000/filters:fill(FFDB5D,1)/almonds-1633bd009c87437bbc889cd07b0dc188.jpg

MEDICINAL IMPORTANCE OF ALMOND

The almond is a popular nutritious food, rich in healthy fats, protein, minerals and vitamins. It also has medicinal value used for treating various diseases. The seeds of prunus amydalus possess various pharmacological properties such as anti-stress, anti-oxidant, immune stimulant, lipid lowering and laxative. Almonds are an effective dietary supplement for blood loss, as they contain iron, vitamins and copper [40].

PHYTOSTEROLS AND ANTIOXIDANTS

Tree nuts, including almonds, contain no dietary cholesterol but are good in chemical-related phytosterols, a group of chemicals that interfere with the absorption of cholesterol and thus help maintain healthy blood cholesterol levels. The most abundant phytosterols in plants are b-sitosterol, campesterol, stigmasterol and 5-avenasterol. The reduction in cholesterol in the production of nuts in human studies has often been more than predictable on the basis of the exchange of fatty acids and high MUFAs content. Phytosterols in nuts may be responsible for part of this effect [21].

FIGURE 8. Almond Medical Properties
https://www.herbazest.com/herbs/almond

REDUCED RISK OF CARDIOVASCULAR DISEASE

Epidemiological studies have been surprisingly inconsistent in demonstrating the link between nut use and lower possibility of CHD [18, 30, 44]. Observational studies have shown a median reduction in CHD mortality of 37% (low risk (RR) ¼ 0.63, 95% confidence interval (CI): 0.51, 0.83) or a reduced 8.3% reduction in CHD mortality risk per week each of the nuts [37]. The positive effects of almond use are similar to different clinical outcomes: sudden cardiac death, myocardial infarction, and fatal CHD. Taken together, these epidemiological findings provide strong evidence of cardioprotective benefits of nut use [44].

WEIGHT MAINTENANCE

Epidemiological studies suggest that those who eat nuts regularly (five times every seven days) tend to have lower body mass indices [9, 19, 52]. These observations led to research on almonds to understand potential mechanisms of weight loss and weight maintenance. Almond seeds are high in protein and fiber and have a low blood glucose index [24].

EFFECT ON DIABETES AND GLYCEMIC CONTROL

Population with Diabetes Mellitus are at greater possibility of developing cardiovascular diseases and intake of almonds can help high risk population against cardio vascular diseases [27]. Scientists observed 35 patients in 42 week with metabolic disorder and type 2 diabetes (diabetes mellitus) using almonds with high protein, high fat (40% fat, 25% protein and 22% MUFA (monounsaturated fatty acid) in diets. The result showed the control in glycemic index was normalized in all 10 patients, 12 patients were dropped out in first week and weight loss was observed. Thus, controlled diet can be a synonym with heart healthy diet. Clinical intervention shows that almond can improve markers other than serum lipids with diabetes mellitus and had also intervention with the risk of cardio vascular disease. Blood glucose control is critical for anticipation and management of diabetes mellitus [34, 48].

Low blood glucose index foods have been shown to be fruitful in increasing insulin sensitivity to prevent high amount of insulin in blood [27]. Almond consumption governs satiety and can improve HDL (high density lipoprotein) in blood, thereby, improving cognitive function [8, 14, 51]. Scientists studied 137 participants with increased risk of type 2 diabetes. There was a greater decrease in the feeling of hunger and serum glucose concentration to the population that consumed almond at snack time and also despite of taking almond there was no weight gain [14]. In another study by [11], 29 parents and 29 children's consumed almonds, 1.5 ounce per day. It was reported that almonds promote cognitive function, and energy restricted over weight for obese adults. Recent study showed memory increase in obese children and improvement in diet quality [16].

LIPIDEMIC CONTROL

The positive results of up taking of almond regularly are to regulate lipid level in blood. Random controlled meta-analyzes describe an association between almond reduction and a consumption in low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) and total cholesterol (TC), but, no significant results have been notice with respect to high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), triglycerides (TG) or LDL-c/HDL-c ratio [25].

CONCLUSION

We have discussed the phytochemical profile, nutritional importance, and medicinal importance of almond kernel, a famous and essential medicinal plant with a long history of use. Almonds deliver a massive amount of nutrients they are the edible seeds of Prunus dulcis, they are loaded with antioxidants and are a fantastic source of antioxidants. The almond nuts are rich in proteins, fat, vitamins (vitamin E, vitamin K), carbohydrates, minerals (magnesium, copper, etc.) and various bioactive compounds (polyphenols, phytosterols, etc.) and are utilize as natural antioxidant activities. Regular taking of nuts would be linked with reduced the risk of several disorders, as well as diabetes mellitus, hypertension, metabolic syndrome, obesity and cardiovascular diseases.

REFERENCES

[1] ABDULLAH MK, HUSSAIN MK. Badam (Prunus amygdalus Bail.): A Fruit with Medicinal Properties. *International Journal of Herbal Medicine.* 2017, **5**(5): 114-117.

[2] AHRENS S, VENKATACHALAM M, MISTRY AM, LAPSLEY K, SATHE SK. Almond (Prunus dulcis L.) protein quality. *Plant Foods for Human Nutrition.* 2005, **60**(3): 123-128.

[3] ALOZIE YETUNDE E, UDOFIA US. Nutritional and sensory properties of almond (Prunus amygdalu Var. Dulcis) seed milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences.* 2015, **10**(2): 117-121.

[4] AMICO V, BARRESI V, CONDORELLI D, SPATAFORA C, TRINGALI C. Antiproliferative Terpenoids from Almond Hulls (Prunus dulcis): Identification and Structure− Activity Relationships. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2006, **54**(3): 810-814.

[5] AUNE D, KEUM N, GIOVANNUCCI E, FADNES LT, BOFFETTA P, GREENWOOD DC, TONSTAD S, VATTEN LJ, RIBOLI E, NORAT T. Nut consumption and risk of cardiovascular disease, total cancer, all-cause and cause-specific mortality: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMC medicine.* 2016, **14**(1): 207.

[6] BARREIRA J, FERREIRA IC, OLIVEIRA MBP, PEREIRA J. Antioxidant potential of chestnut (Castanea sativa L.) and almond (Prunus dulcis L.) by-products. *Food science and technology international.* 2010, **16**(3): 209-216.

[7] BERRYMAN CE, PRESTON AG, KARMALLY W, DECKELBAUM RJ, KRIS-ETHERTON PM. Effects of almond consumption on the reduction of LDL-cholesterol: a discussion of potential mechanisms and future research directions. *Nutrition reviews.* 2011, **69**(4): 171-185.

[8] BERRYMAN CE, WEST SG, FLEMING JA, BORDI PL, KRIS-ETHERTON PM. Effects of daily almond consumption on cardiometabolic risk and abdominal adiposity in healthy adults with elevated LDL-cholesterol: a randomized controlled trial. *Journal of the American Heart Association.* 2015*,* **4**(1): e000993.

[9] BES-RASTROLLO M, SABATÉ J, GÓMEZ-GRACIA E, ALONSO A, MARTINEZ JA, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ MA. Nut consumption and weight gain in a Mediterranean cohort: The SUN study. *Obesity.* 2007*,* **15**(1): 107-107.

[10] BUDAVARI S, O'NEIL M, SMITH A, HECKELMAN P, KINNEARY J. (2001). The Merck Index, Whitehouse Station, NJ: Merck Research Laboratories Division of Merck & Co: Inc.

[11] BURNS AM, ZITT MA, ROWE CC, LANGKAMP-HENKEN B, MAI V, NIEVES JR C, UKHANOVA M, CHRISTMAN MC, DAHL WJ. Diet quality improves for parents and children when almonds are incorporated into their daily diet: a randomized, crossover study. *Nutrition research.* 2016*,* **36**(1): 80-89.

[12] CHEN CY, LAPSLEY K, BLUMBERG J. A nutrition and health perspective on almonds. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2006*,* **86**(14): 2245-2250.

[13] CHRISTIAN A, UKHUN ME. Nutritional potential of the nut of tropical almond (Terminalia catappia L.). *Pakistan Journal of Nutrition.* 2006*,* **5**(4): 334-336.

[14] DE SOUZA RGM, SCHINCAGLIA RM, PIMENTEL GD, MOTA JF. Nuts and human health outcomes: A systematic review. *Nutrients.* 2017*,* **9**(12): 1311.

[15] DEL RIO D, RODRIGUEZ-MATEOS A, SPENCER JP, TOGNOLINI M, BORGES G, CROZIER A. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling.* 2013*,* **18**(14): 1818-1892.

[16] DHILLON J, TAN S-Y, MATTES RD. Effects of almond consumption on the post-lunch dip and long-term cognitive function in energy-restricted overweight and obese adults. *British Journal of Nutrition.* 2017*,* **117**(3): 395-402.

[17] FALCONE FERREYRA ML, RIUS S, CASATI P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science.* 2012*,* **3**(222.

[18] FRASER GE, SABATE J, BEESON WL, STRAHAN TM. A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease: the Adventist Health Study. *Archives of Internal medicine.* 1992*,* **152**(7): 1416-1424.

[19] GARCIA-LORDA P, RANGIL IM, SALAS-SALVADO J. Nut consumption, body weight and insulin resistance. *European Journal of Clinical Nutrition.* 2003*,* **57**(1): S8-S11.

[20] GARCIA-SALAS P, MORALES-SOTO A, SEGURA-CARRETERO A, FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules.* 2010*,* **15**(12): 8813-8826.

[21] GRIEL AE, KRIS-ETHERTON PM. Tree nuts and the lipid profile: a review of clinical studies. *British Journal of Nutrition.* 2006*,* **96**(S2): S68-S78.

[22] HARBORNE JB, WILLIAMS CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 2000*,* **55**(6): 481-504.

[23] HARRIS L, FERGUSON L. (2013). Improving the safety of almonds and pistachios *Improving the safety and quality of nuts* (pp. 350-378): Elsevier.

[24] HOLT SH, BRAND MILLER J, PETOCZ P, FARMAKALIDIS E. A satiety index of common foods. *European Journal of Clinical Nutrition.* 1995*,* **49**(9): 675-690.

[25] HUGHEY CA, JANUSZIEWICZ R, MINARDI CS, PHUNG J, HUFFMAN BA, REYES L, WILCOX BE, PRAKASH A. Distribution of almond polyphenols in blanch water and skins as a function of blanching time and temperature. *Food Chemistry.* 2012*,* **131**(4): 1165-1173.

[26] KABERA JN, SEMANA E, MUSSA AR, HE X. Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J Pharm Pharmacol.* 2014*,* **2**(377-392.

[27] KENDALL CW, ESFAHANI A, TRUAN J, SRICHAIKUL K, JENKINS DJ. Health benefits of nuts in prevention and management of diabetes. *Asia Pacific journal of clinical nutrition.* 2010*,* **19**(1): 110.

[28] KESER S, DEMIR E, YILMAZ O. Some Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of the Bitter Almond Kernel (Prunus dulcis var. amara). *Journal of the Chemical Society of Pakistan.* 2014, **36**(5).

[29] KESTER DE, GRADZIEL TM, GRASSELLY C. Almonds (Prunus). *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops 290.* 1991: 701-760.

[30] KUSHI LH, FOLSOM AR, PRINEAS RJ, MINK PJ, WU Y, BOSTICK RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *New England Journal of Medicine.* 1996, **334**(18): 1156-1162.

[31] LI K-Y, SHI Q-H, ZHU H-L, TANG D-R. Study on main nutrient composition of bitter almond. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica.* 2003, **2**(040.

[32] LI K-Y, SHI Q-H, ZHU H-L, TANG D-R. Chemical compositions in bitter almond. *Journal-Northwest Forestry University.* 2004, **19**(2): 124-126.

[33] LÓPEZ R, BURGOS P, HERMOSO JM, HORMAZA JI, GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ JJ. Long term changes in soil properties and enzyme activities after almond shell mulching in avocado organic production. *Soil and Tillage Research.* 2014, **143**(155-163.

[34] LOVEJOY JC, MOST MM, LEFEVRE M, GREENWAY FL, ROOD JC. Effect of diets enriched in almonds on insulin action and serum lipids in adults with normal glucose tolerance or type 2 diabetes. *The American journal of clinical nutrition.* 2002, **76**(5): 1000-1006.

[35] MANACH C, SCALBERT A, MORAND C, RÉMÉSY C, JIMÉNEZ L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition.* 2004, **79**(5): 727-747.

[36] MBAH B, EME P, EZE C. Nutrient potential of Almond seed (Terminalia catappa) sourced from three states of Eastern Nigeria. *African Journal of Agricultural Research.* 2013, **8**(7): 629-633.

[37] MEXIS S, BADEKA A, CHOULIARA E, RIGANAKOS K, KONTOMINAS M. Effect of γ-irradiation on the physicochemical and sensory properties of raw unpeeled almond kernels (Prunus dulcis). *Innovative Food Science & Emerging Technologies.* 2009, **10**(1): 87-92.

[38] MILBURY PE, CHEN C-Y, DOLNIKOWSKI GG, BLUMBERG JB. Determination of flavonoids and phenolics and their distribution in almonds. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2006, **54**(14): 5027-5033.

[39] PINELO M, RUBILAR M, SINEIRO J, NUNEZ M. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (Prunus amygdalus) and pine sawdust (Pinus pinaster). *Food Chemistry.* 2004, **85**(2): 267-273.

[40] RAO HJ. Therapeutic applications of almonds (Prunus amygdalus L.): a review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2012, **6**(1): 130-135.

[41] ROBBINS RJ. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2003, **51**(10): 2866-2887.

[42] ROS E, MATAIX J. Fatty acid composition of nuts–implications for cardiovascular health. *British Journal of Nutrition.* 2006, **96**(S2): S29-S35.

[43] RUBILAR M, PINELO M, SHENE C, SINEIRO J, NUÑEZ MJ. Separation and HPLC-MS identification of phenolic antioxidants from agricultural residues: almond hulls and grape pomace. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2007, **55**(25): 10101-10109.

[44] SABATE J, ANG Y. Nuts and health outcomes: new epidemiologic evidence. *The American journal of clinical nutrition.* 2009, **89**(5): 1643S-1648S.

[45] SAHIB ZH. Assessment of anxiolytic activity of nuts of Prunus amygdalus Dulcis (almond) in mice. *Medical Journal of Babylon.* 2014, **11**(4): 817-824.

[46] SATHE S. Solubilization, electrophoretic characterization and in vitro digestibility of almond (Prunus amygdalus) proteins 1, 2. *Journal of food biochemistry.* 1992, **16**(4): 249-264.

[47] SCHWINGSHACKL L, BECHTHOLD A, SCHWEDHELM C, HOFFMANN G, SCHLESINGER S, BOEING H. Food groups and risk of coronary heart disease, stroke and heart failure: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Das Gesundheitswesen.* 2017, **79**(08/09): V-264.

[48] SCOTT LW, BALASUBRAMANYAM A, KIMBALL KT, AHERNS AK, FORDIS CM, BALLANTYNE CM. Long-term, randomized clinical trial of two diets in the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2003*,* **26**(8): 2481-2482.

[49] SHAHIDI F. (1997). *Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications*: The American Oil Chemists Society.

[50] SOLER L, CANELLAS J, SAURA-CALIXTO F. Oil content and fatty acid composition of developing almond seeds. *Journal of agricultural and food chemistry.* 1988*,* **36**(4): 695-697.

[51] TAN SY, MATTES R. Appetitive, dietary and health effects of almonds consumed with meals or as snacks: a randomized, controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition.* 2013*,* **67**(11): 1205-1214.

[52] TERNUS ME, LAPSLEY K, GEIGER CJ. (2009). *Health benefits of tree nuts*: CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL.

[53] VENKATACHALAM M, TEUBER SS, ROUX K, SATHE S. Effects of roasting, blanching, autoclaving, and microwave heating on antigenicity of almond (Prunus dulcis L.) proteins. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2002*,* **50**(12): 3544-3548.

[54] WIRTHENSOHN M, CHIN W, FRANKS T, BALDOCK G, FORD C, SEDGLEY M. Characterising the flavour phenotypes of almond (Prunus dulcis Mill.) kernels. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology.* 2008*,* **83**(4): 462-468.

[55] YADA S, LAPSLEY K, HUANG G. A review of composition studies of cultivated almonds: Macronutrients and micronutrients. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2011*,* **24**(4-5): 469-480.

Editor − Michał Nowicki

Received: 24.05.2021
Accepted: 20.07.2021
Shabbir Hussain
e-mail: dr.shabbirhussain@lgu.edu.pk, shabchem786@gmail.com
mob # +92-3214140130

INFORMACJE

INFORMACJA o dostępności pełnych artykułów publikowanych w PBK oraz publikacji elektronicznej

Pełne wersje artykułów opublikowanych w „Postępach Biologii Komórki” po 2008 roku są dostępne bezpłatnie pod adresem: http://www.pbkom.eu/pl/pbk-publikacje.

Warunki otrzymywania czasopisma

– złożenie zamówienia: faxem, pocztą itp.
– jednoczesne dokonanie wpłaty na konto:

Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej w Poznaniu
Nr konta w BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209
– po otrzymaniu wpłaty wystawiamy fakturę VAT.

W sytuacji, kiedy wpłata nastąpi w trakcie trwania prenumeraty, wysyłamy wszystkie zeszyty (numery) czasopisma, które ukazały się w okresie objętym prenumeratą.

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata roczna
Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty na rok 2021 pod adresem:
FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań; tel. (61) 854-64-58, fax. (61) 854-64-40
email: zpodemsk@ump.edu.pl
na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań; BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209

Cena prenumeraty rocznika wynosi	na rok 2021
dla instytucji (bibliotek)	230 zł + 8% VAT
dla odbiorców indywidualnych	83 zł + 8% VAT

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2021
should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of
POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Swiecickiego str. 6, 60-781 Poznan/Poland
+48 61 854-64-58, fax. +48 61 854-64-40, email: zpodemsk@ump.edu.pl
On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ
Swiecickiego str. 6, 60-781 Poznan/Poland, BZWBK: 68 1090 1476 0000 0001 3211 8209
Price per year 50 dollars USA or 30 euro

Cennik dla Autorów rycin i druku w 2021 r.

	publikacja pracy	str. druku (ponad 15) 1 str.
Cena zł	1500,00	50,00

Do ceny należy doliczyć 8% VAT.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI (PBK) drukują artykuły przeglądowe w języku polskim lub angielskim z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym oraz Słownikiem Biologii Komórki PAU 2008. Artykuły drukowane w PBK bez zgody redakcji nie mogą być publikowane w innych periodykach.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają:

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 5000 słów (do sumy tej nie wlicza się strony tytułowej, streszczenia, podziękowań, tabel wraz z opisami, opisów rycin oraz literatury) i do 100 pozycji bibliograficznych ze szczególnym uwzględnieniem ostatnich 5 lat;
2) doniesienia z ostatniej chwili nie przekraczające 1500 słów z maksymalnie 10 pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji);
3) listy do redakcji (do 350 słów).

Wszystkie artykuły, wyłącznie w wersji elektronicznej, należy kierować na adres mailowy mnowicki@ump.edu.pl

Sposób przygotowania artykułów:

1. list przewodni – kierowany przez autora prowadzącego korespondencję do kolegium redakcyjnego Postępów Biologii Komórki musi zawierać
   i. informację, że artykuł, jak dotąd, nie został opublikowany w innym czasopiśmie (z wyjątkiem streszczenia), jak i nie został wysłany do innego czasopisma celem rozważenia możliwości jego publikacji
   ii. oświadczenie autora zajmującego się korespondencją, że wszyscy współautorzy zapoznali się z treścią artykułu i zaakceptowali jego treść
   iii. oświadczenie o występowaniu lub braku konfliktu interesów autora/autorów artykułu
   iv. przedstawienie zakresu pracy (ang. contribution) włożonego przez każdego z autorów artykułu w przygotowanie manuskryptu
   v. oświadczenie, że artykuł po przyjęciu do druku w PBK przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji
2. strona tytułowa musi zawierać tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona i nazwiska autorów z afiliacją, liczbę słów znajdujących się w artykule (z zastrzeżeniami podanymi wyżej), liczbę tabel i rycin, słowa kluczowe (3-5 słów zgodnych z Medical Subject Headings), skrót tytułu pracy (maks. 40 znaków), informację o finansowaniu artykułu oraz dane autora prowadzącego korespondencję (adres pocztowy, e-mail, numer telefonu oraz numer faxu)
3. streszczenie artykułu w języku polskim i angielskim – maksymalnie 300 słów
4. w tytule i streszczeniu można wprowadzać jedynie powszechnie przyjęte skróty (np. DNA)
5. zasadniczy tekst (Times New Roman 12 pkt., odstęp 1,5 wiersza) należy podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały (należy przyjąć następujący sposób numeracji rozdziałów i podrozdziałów: 1, 1.1, 1.1.1, 1.1.2 itd.)
6. ostateczna wersja tekstu powinna być zapisane w formacie doc. lub docx.
7. tabele wraz z opisami należy umieszczać na końcu artykułu; jednostki miar muszą być zgodne z układem SI;
8. ryciny i schematy należy zapamiętywać w formacie tiff. lub jpg. w jakości minimum 300 dpi; w przypadku publikowania mikrofotografii należy zamieszczać na nich podziałkę (scale bar); wartość podziałki należy podać w opisie mikrofotografii; jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, a zamieszcza się je w niezmienionej formie, należy podać skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na ich reprodukcję;
9. objaśnienia i podpisy rycin, zdjęć i w tabelach powinny być podane w j. polskim i angielskim
10. sposób przygotowania literatury: skróty nazw czasopism podawać należy według Index Medicus; cytowanie literatury w tekście – z zastosowaniem nawiasu kwadratowego (np. [5]); spis literatury należy zestawić alfabetycznie według następującego wzoru:

    [1] BEN-CHETRIT E, CHAN EK, SULLIVAN KF, TAN EM. A 52-kD protein is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. J Exp Med 1988; **167**: 1560-1571.

    [2] BEUTLER B. Toll-like receptors and their place in immunology. Nature 2004; **430**: 498-518.

    [3] ELSTON CW. Grading of invasive carcinoma of the breast. In Page DL and Anderson TJ eds. Diagnostic histopathology of the breast. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987;300-311.

Odpłatność (kwoty brutto)

1. opłata za wydrukowanie artykułu nieprzekraczającego 15 stron druku – 1500 zł
2. strona druku (powyżej 15) – dodatkowo 50 zł za jedną stronę

Skierowanie pracy do PBK celem rozważenia możliwości jej publikacji jest tożsame z akceptacją przez autorów pracy regulaminu przyjmowania, oceny i publikowania artykułów naukowych w tym czasopiśmie.

Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji maksymalnie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni od chwili otrzymania recenzji nie odpowiedzą na list redaktora.

Autor zobowiązany jest do wykonywania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu 48 godzin do redakcji. Koszty spowodowane większymi zmianami tekstu, wprowadzanymi w korekcie autorskiej poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów i zmian w manuskrypcie.

Po zaksięgowaniu kwoty związanej z publikacją artykułu w Postępach Biologii Komórki na koncie fundacji wszyscy autorzy otrzymują 1 egzemplarz zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz plik PDF zawierający opracowany przez redakcję manuskrypt (wydrukowane zeszyty oraz plik PDF są wysyłane odpowiednio na adres pocztowy oraz e-mail autora zajmującego się korespondencją). Autorzy mogą również zamówić większą liczbę wydrukowanych reprintów swojej pracy, a ich koszt będzie podany do wiadomości autorów na stosownym druku zamówienia.

TREŚĆ – CONTENTS

HIPPMANN N., RZYMSKI P. : 83
Komórki macierzyste i inżynieria tkankowa w technologii pozaustrojowej produkcji mięsa
Stem cells and tissue engineering for cultured meat production

MRÓZ A., MIODOWSKA D., MURZYN A., OBAJTEK N., BOJDO P., ORZEŁ J., RAJEK K., TATARUCH A., PISKA K., PĘKALA E.: 107
Antracykliny we współczesnej onkologii: mechanizm działania, toksyczność, możliwości terapeutyczne
Anthracyclines in a modern oncology: mechanism of action, toxicity and therapeutic potential

SKRZYPEK W., DUDEK D., MIŁEK J., KNAPIK J., KOWALSKA U., OWECKI M.: 129
Molekularne podłoże otyłości: rola adiponektyny, leptyny, apeliny i chemeryny w patogenezie otyłości
Molecular basis of obesity: role of adiponectin, leptin, apelin and chemerin in the pathogenesis of obesity

RASHEED R.B., HUSSAIN S., SYED S.K.: 147
Phytochemistry, nutritional and medicianl value of kiwi fruit

SIDDIQUA A., HUSSAIN S., SYED S.K.: 167
Phytochemistry, nutritional and medicinal importance of almond

Informacje 181

Indeks 369705