

Received: 18.07.2019
Accepted: 22.01.2020
Published: 14.05.2020

Rubiskoliny – biologiczne aktywne peptydy pochodzenia roślinnego*

Rubiscolins: Biologically active peptides of plant origin

Marta Sobolczyk, Renata Perlikowska

Zakład Chemii Biomolekularnej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Dwa peptydy opioidowe pochodzenia naturalnego, które wykazują wysokie powinowactwo i wybiórczość w stosunku do receptora opioidowego typu δ , rubiskolina-5 i -6, zostały wyizolowane ze szpinaku w 2001 r. Ich prekursorem jest karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu [EC 4.1.1.39 (RuBisCO)], która poddana degradacji pepsyną, uwalnia te sekwencje. Najważniejszą zaletą rubiskolin jest ich biodostępność. Oba peptydy wykazały działanie przeciwbólowe nie tylko po podaniu dokomorowym, ale również doustnym. Ponadto rubiskolina-6 usprawniła konsolidację pamięci, wpływając na proces uczenia się i zapamiętywania oraz działała przeciwłękowo. U zwierząt poddanych procedurze stresu ostrego rubiskolina-6 działała przeciwdepresyjnie. Istotny jest również wpływ tego peptydu na regulację przyjmowania pokarmu, czyli pobudzanie łaknienia przy spożyciu zbilansowanych posiłków i jego hamowanie w przypadku stosowania diety wysokotłuszczowej. W artykule podsumowano wiadomości dotyczące rubiskolin oraz badania z zakresu struktura-aktywność dla otrzymanych analogów. Naturalnie występujące opioidy, takie jak rubiskoliny, mogą służyć jako pierwowzór nowych leków lub żywności funkcjonalnej.

Słowa kluczowe:

RuBisCo • peptydy opioidowe • receptory opioidowe • synteza peptydów • ligandy receptora opioidowego typu δ

Summary

Two food-derived opioid peptides with high δ -opioid receptor affinity and selectivity, rubiscolin-5 and rubiscolin-6, were isolated from spinach leaves in 2001. Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase [EC 4.1.1.39 (RuBisCO)], digested by pepsin, is known as a precursor for them. The most important advantage of rubiscolins is their oral bioavailability. Both peptides produced analgesia not only after intracerebroventricular administration, but also orally. Moreover, rubiscolin-6 enhanced memory consolidation, influenced the processes of learning and memory, and reduced anxiety. In an animal model of acute stress, rubiscolin-6 induced an antidepressive-like effect. Moreover, this peptide regulated food intake, stimulated appetite in mice fed a balanced diet and suppressed food intake in case of high-fat diet. This review summarizes various biological activities of rubiscolins and recent developments on the structure-activity relationship of rubiscolin analogs, aimed at improving their pharmacological properties. Naturally occurring opioids, such as rubiscolins, can serve as the basis of new therapeutics or functional foods.

Keywords:

RuBisCo • opioid peptides • opioid receptors • peptide synthesis • δ -opioid receptor ligands

*Praca była finansowana ze środków Uniwersytetu Medycznego w Łodzi: 502-03/1-156-02/502-14-324-17.

GICID	01.3001.0014.1413
DOI:	10.5604/01.3001.0014.1413
Word count:	3434
Tables:	1
Figures:	6
References:	22

Adres autorki: dr hab. n. med. Renata Perlikowska, Zakład Chemii Biomolekularnej, Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Mazowiecka 6/8, 92-215 Łódź; e-mail: renata.perlikowska@umed.lodz.pl

Wykaz skrótów: **AMPK** – kinaza białkowa aktywowana przez AMP (AMP-activated protein kinase); **BD1047** – selektywny antagonist receptoru σ_1 ; **BMY14802** – antagonist receptoru σ_1 i agonista receptora 5-HT_{1A}; **CHO** – linia komórek chemicznych (chinese hamster ovary); **CoMFA** – porównawcza analiza pola molekularnego (comparative molecular field analysis); **CoMSIA** – porównawcza analiza cząsteczkowych indeksów podobieństwa (comparative molecular similarity index analysis); **COX-2** – cyklooksigenaza-2 (cyclooxygenase-2); **CRF** – czynnik uwalniający kortykotropinę (corticotropin-releasing factor); **DAMGO** – agonista receptorów opioidowych μ , Tyr-D-Ala-Gly-MePhe-Gly-ol; **ddY** – nazwa szczepu myszy, pochodząca od wielkich liter Deutschland, Denke i Yoken; **DHEA** – dehydroepiandrosteron (dehydroepiandrosterone); **DPDPE** – agonista receptorów opioidowych δ , Tyr-c(D-Pen-Gly-Phe-D-Pen); **GLUT4** – transporter glukozy typu 4 (glucose transporter type 4); **GPI** – test na izolowanych wycinkach jelita cienkiego świnki morskiej (guinea-pig ileum); **HSO24** – antagonist receptoru melanokortyny 4; **icv** – podanie dokomorowe (intracerebroventricular); **ip** – podanie dootrzewnowe (intraperitoneal); **LMA** – test mierzący aktywność ruchową (locomotor activity); **L-PGDS** – syntaza typu lipokaliny-prostaglandyny D₂ (lipocalin-type prostaglandin D synthase); **MC** – melanokortyna (melanocortin); **MC₄** – receptor melanokortyny 4 (melanocortin-4 receptor); **MVD** – test na izolowanych nasieniowodach myszy (Mouse vas deferens); **NTI** – antagonist receptorów opioidowych δ , naltrindol; **NPY** – neuropeptyd Y (neuropeptide Y); **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy; **pAMPK** – ufosforylowana kinaza zależna od AMP (phosphorylation of AMPK); **PGD₂** – prostaglandyna D₂ (prostaglandin D₂); **PLC** – fosfolipaza C (phospholipase C); **QSAR** – ilościowa analiza zależności między strukturą a aktywnością (quantitative structure-activity relationship); **RuBisCO** – karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu, EC 4.1.1.39 (ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase); **sc** – wstrzyknięcie podskórne (subcutaneous); SCH23390 – antagonist receptoru dopaminowego D₁; **STZ** – streptozotocyna (streptozotocin); **TEWL** – transepidermalna utrata wody (transepidermal water loss); **TST** – test podwieszania za ogon (tail-suspension test); **Tyr-MIF-1** – Tyr-Pro-Leu-Gly-NH₂; **Tyr-W-MIF-1** – Tyr-Pro-Trp-Gly-NH₂.

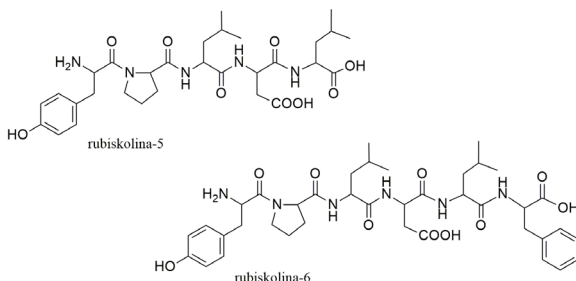
WSTĘP

Receptory opioidowe typu μ , δ , i κ są wyspecjalizowanymi transbłonowymi strukturami białkowymi, sprzężonymi z białkiem G, umiejscowionymi przede wszystkim w OUN, ale również w tkankach obwodowych, głównie w przewodzie pokarmowym, sercu czy nerkach [6]. Pośredniczą w wiązaniu ligandów, którymi są peptydy opioidowe, z układem efektorowym. Peptydy opioidowe charakteryzują się krótką sekwencją aminokwasów, naśladując działanie opiatów w mózgu i odgrywają krytyczną rolę w wielu procesach biologicznych, w tym w analgezji, sterowaniu procesami oddechowymi i pokarmowymi, wywoływaniu stanów euforii, apatii czy senności. Do grupy endogennych peptydów opioidowych umiejscowionych w komórkach układu nerwowego i tkankach obwodowych, uwalnianych jako produkty proteolitycznej degradacji odpowiednich prekursorów, zalicza się: enkefaliny, β -endorfinę, dynorfiny, endomorfiny i nocycetynę/orfaninę [7, 18]. Wyodrębnia się rów-

nież grupę peptydów wyizolowanych zarówno z mózgu (Tyr-MIF-1 i Tyr-W-MIF-1) i różnych płynów ustrojowych ssaków (β -kazomorfiny, hemorfiny), skóry płazów (dermorfina, dermenkefalina, deltorfiny I i II), jak i białek pochodzenia roślinnego (egzorfiny glutenowe, oryzatensyna, rubiskoliny) [22].

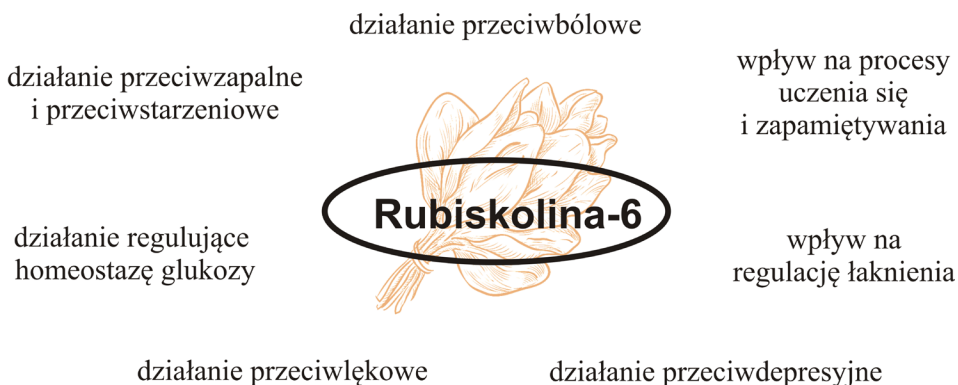
Uwzględniając to, że tradycyjne opiaty, czy też inne substancje działające przez receptory opioidowe, oprócz działania terapeutycznego, wykazują wiele działań niepożądanych, takich jak: uzależnienie, depresja oddechowca czy uporczywe zaparcia, poszukuje się wciąż nowych źródeł bioaktywnych peptydów mogących oddziaływać z odpowiednimi receptorami i regulować ich funkcje. Wiele wskazuje na to, że niektóre biologicznie aktywne peptydy uwalniane z białek żywności, mogą być bezpieczne i znajdują zastosowanie w profilaktyce lub nawet terapii wielu chorób. Jednym z przykładów jest enzym odpowiedzialny za przebieg fotosyntezy i fotooddychania, RuBisCO [EC 4.1.1.39], jedno z bardziej

rozpowszechnionych białek występujących u większości organizmów autotroficznych, od prokariotów (bakterie fotosyntetyczne i chemoautotroficzne, cyjanobakterie i archeony) do eukariotów (różne grzyby i rośliny wyższe) [1, 18]. RuBisCo to 30–50% wszystkich rozpuszczalnych białek występujących w liściach roślin, co dowodzi jego znaczącej roli w ich metabolizmie i zarazem czyni z niego białko najbardziej popularne na Ziemi. Ze względu na charakterystyczną kompozycję niezbędnych aminokwasów [13] RuBisCo stało się przedmiotem różnych badań, dotyczących jego właściwości i możliwości zastosowania. Przeprowadzenie degradacji enzymatycznej na białku RuBisCO pochodzącym z liści szpinaku, umożliwiło odkrycie i zidentyfikowanie dwóch bioaktywnych peptydów. Rubiskoliny, po raz pierwszy opisali Yang i wsp. w 2001 r., jako związki selektywne względem receptora opioidowego δ [21]. Charakteryzują się następującą sekwencją: rubiskolina-5 (Tyr-Pro-Leu-Asp-Leu, YPLDL) i rubiskolina-6 (Tyr-Pro-Leu-Asp-Leu-Phe, YPLDLF, znana jako rubixyl) (ryc. 1).



Ryc. 1. Struktura rubiskolin

Wstępne badania nad rubiskolinami wykazały, że związki te działają przeciwbólowo, zarówno po podaniu icv, jak i doustnie, przy czym bardziej odporna na degradację proteolityczną rubiskolina-6 jest aktywniejszym peptydem. W ostatnich latach pojawiły się nowe doniesienia dotyczące badań nad tym 6-aminokwasowym peptydem, potwierdzające jego korzystny profil farmakologiczny i potencjalne możliwości zastosowania (ryc. 2).



Ryc. 2. Właściwości biologiczne rubiskoliny-6

CHARAKTERYSTYKA RUBISKOLIN

Struktura rubiskolin

Struktura rubiskolin różni się od innych tradycyjnych peptydów opioidowych, dlatego można je uznać za „atypowe” opioidy, z zachowaną tylko N-końcową resztą Tyr [8]. Wprawdzie występowanie Pro w pozycji 2 i aminokwasu alifatycznego (Leu) w pozycji 3 wydaje się minimalnym wymogiem do pełnej aktywności opioidowej. Obecność Pro w sekwencji ogranicza znacznie liczbę enzymów, zdolnych do trawienia peptydów. Prolina, o cyklicznej budowie, jest szczególnym aminokwasem. Jej obecność w łańcuchu peptydowym powoduje zmianę kierunku tego łańcucha oraz izomeryzację *cis-trans* wiązania peptydowego z poprzedzającym aminokwasem, co utrudnia dostęp enzymów proteolitycznych. Reszta Pro nadaje stabilność wobec większości proteaz i powoduje, że rubiskolina-6 jest aktywna po podaniu doustnym [20]. Przeprowadzone badania zależności między strukturą a aktywnością rubiskolin wykazały powinowactwo i selektywność do receptora opioidowego δ w teście względnego powinowactwa w obecności [^3H][Ile 5,6]-deltorfiny oraz w teście na wyizolowanych tkankach zwierzęcych [21].

Aktywność biologiczna rubiskolin

W celu określenia aktywności biologicznej *in vitro*, rubiskoliny przebadano dwoma najczęściej stosowanymi testami umożliwiającymi określenie względnego powinowactwa do receptorów opioidowych: w teście na izolowanych tkankach zwierzęcych i w badaniu receptorowym z wykorzystaniem preparatów błonowych [21]. Test funkcjonalny na izolowanych tkankach zwierzęcych peptydów opioidowych przeprowadza się na wycinkach jelita cienkiego świnki morskiej (GPI), w którym występuje duża liczba receptorów μ i κ oraz na izolowanych nasieniowodach myszy (MVD), charakteryzujących się dużą liczbą receptorów δ . Uzyskane w testach funkcjonalnych wyniki dla rubiskolin, były zgodne z powinowactwem określonym w badaniach receptorowych z użyciem preparatów błonowych z mózgu szczura lub linii komórek chemicznych CHO oraz znakowanych izo-

topowo ligandów: [³H]-DAMGO receptora μ , [³H][Ile^{5,6}]-deltorfiny-2 receptora δ_2 oraz [³H]-DPDPE receptora δ_1 . W tabeli 1 przedstawiono rezultaty badań względnego powinowactwa i selektywności rubiskolin wobec receptorów opioidowych μ i δ [21]. Rubiskolina-6 działała prawie półtora razy silniej w teście GPI i około dwa razy silniej w teście MVD niż rubiskolina-5. Jej selektywność względem receptora δ była również większa. Ponadto powinowactwo rubiskoliny-6 do receptora opioidowego κ było znikome [5]. Badania receptorowe z użyciem preparatów błonowych z mózgu szczura i komórek CHO potwierdziły, że rubiskoliny są ligandami receptorów opioidowych δ .

Niedawne doniesienia Cassell i wsp., wskazują, że rubiskoliny są wybiórczymi ligandami aktywującymi receptory sprzężone z białkiem G, z niewielkim udziałem białka β -arestyny [3], co wydaje się korzystne z punktu widzenia ograniczenia działań niepożądanych, wywołanych przez opioidy. Badania przeprowadzone na myszach pozbawionych genu kodującego β -arestynę 2 ujawniły, że działania niepożądane podawania opioidów mogą wynikać z zaangażowania białka β -arestyny 2 [19]. Obserwacje te zainicjowały poszukiwania związków, które aktywują wyłącznie receptory sprzężone z białkiem G, bez włączenia szlaku β -arestyny.

AKTYWNOŚĆ *IN VIVO*

Przeciwbólowe właściwości rubiskolin

W celu określenia właściwości przeciwbólowych, przeprowadzono test behawioralny „rzucania” ogona (tail pinch) na myszach, po podaniu icv lub obwodowym (doustnie) [21]. Działanie przeciwbólowe rubiskolin zależało od dawki. Po podaniu icv rubiskolina-6 była aktywniejsza przy niższych dawkach niż rubiskolina-5, odpowiednio 1 nmol/zwierzę i 3 nmol/zwierzę (minimalna dawka). Najsilniejsza odpowiedź była po 10 min od iniekcji rubiskoliny-6, natomiast czas działania wynosił około 30 min. Oba peptydy miały również działanie przeciwbólowe po podaniu doustnym (minimalna dawka 100 mg/kg), przy czym rubiskolina-6 działała silniej. Działanie przeciwbólowe rubiskoliny-6 po podaniu icv w dawce 35 nmol/zwierzę

było hamowane przez jednoczesne podanie antagonisty opioidowego δ , NTI w dawce 1 mg/zwierzę (sc), co świadczyło o udziale receptorów δ w przekazywaniu działania analgetycznego badanego peptydu.

WPŁYW RUBISKOLIN NA PROCESY UCZENIA SIĘ I ZAPAMIĘTYWANIA

W celu określenia wpływu rubiskolin na mechanizmy uczenia się i zapamiętywania przeprowadzono test biernego unikania (passive avoidance test) na myszach szczepu ddY, dla dawek niższych niż te wywołujące działanie przeciwbólowe (10 nmol/zwierzę) [20]. Poprawę konsolidacji pamięci zaobserwowano tylko w przypadku rubiskoliny-6, dla której wykres zależności dawka-efekt miał kształt dzwonowy, a maksymalna odpowiedź dotyczyła dawki 3 nmol/zwierzę po podaniu icv oraz dawki 100 mg/kg po podaniu doustnym. Rubiskolina-5 nie miała żadnego działania, mimo zwiększenia dawek do: 10 nmol/zwierzę (icv) i 300 mg/kg (doustnie), co mogło wynikać z jej niższej selektywności wobec receptora opioidowego δ [21]. Zdolność rubiskoliny-6 do konsolidacji pamięci została zahamowana przez podanie NTI w dawce 1 mg/zwierzę (sc), co świadczyło o udziale receptorów δ w przekazywaniu działania stymulującego procesy uczenia się i zapamiętywania. Inna hipoteza dotycząca wpływu na konsolidację pamięci wynikająca z badań nad aktywnością przeciwlękową, zakłada udział endogennych ligandów receptora σ , takich jak DHEA, których poziom zależy od aktywacji receptorów opioidowych δ , a następnie receptorów serotoninowych i dopaminowych [22].

Działanie przeciwlękowe

Hirata i wsp. badali potencjalny efekt przeciwlękowy rubiskoliny-6 w zwierzęcym modelu lęku, bazującym na naturalnej awersji gryzoni do eksplorowania podwyższonych i otwartych przestrzemi: w teście podniesionego labiryntu krzyżowego (elevated-plus maze) u myszy ddY [5]. Rubiskolina-6 była aktywna w dawce 10 mg/kg po podaniu ip, aczkolwiek większa dawka (30 mg/kg) nie wpłynęła na zmianę czasu i liczby wizyt na otwartych ramionach labiryntu (brak działania przeciwlękowego).

Tabela 1. Powinowactwo rubiskolin do receptorów opioidowych, na podstawie [21]

Peptyd	Sekwencja	Aktywność opioidowa ¹		GPI/ MVD	Powinowactwo do receptora ¹		
		GPI	MVD		μ^a	δ_2^b	δ_1^c
Rubiskolina-5	Tyr-Pro-Leu-Asp-Leu	1110 ± 71	51,0 ± 6,6	21,8	1085 ± 165	2,09 ± 0,06	1,97 ± 0,30
Rubiskolina-6	Tyr-Pro-Leu-Asp-Leu-Phe	748 ± 207	24,4 ± 3,6	30,7	>2000	0,93 ± 0,04	0,90 ± 0,29

¹ Wyrażone jako $IC_{50} \pm SEM$ [μ M]; wartość IC_{50} to połowa maksymalnego stężenia hamującego.

^a Wypieranie [³H]DAMGO.

^b Wypieranie [³H][Ile^{5,6}]deltorfiny-2.

^c Wypieranie [³H]DPDPE.

Peptyd ten podawany doustnie w dawce 100 mg/kg również wykazał efekt przeciwlękowy. Nie zaobserwowano wpływu na aktywność lokomotoryczną, ponieważ nie uległa zmianie całkowita liczba wizyt na otwartych i zamkniętych ramionach labiryntu w ciągu 5 minut.

Zaburzenia aktywności układu opioidowego i dopaminergicznego wpływają na pojawienie się niekorzystnych zmian emocjonalnych, w tym lęku [16]. Agoniści receptora opioidowego δ mogą aktywować mezolimbiczny i nigrostriatalny szlak dopaminergiczny w OUN i powodować uwalnianie dopaminy w prążkowie i jądrze półleżącym, co potwierdzili Hirata i wsp. techniką mikrodializy *in vivo* [5]. Infuzja rubiskoliny-6 (10 mM, 1 μ l/min) spowodowała zwiększenie uwalniania dopaminy 1,4 (w prążkowie) i 1,3-krotnie (w jądrze półleżącym). Dlatego w celu zbadania mechanizmu leżącego u podstaw efektu anksjolitycznego rubiskolina-6 (10 mg/kg, ip lub 100 mg/kg, doustnie) podawana była z antagonistami: NTI (1 mg/kg, sc), SCH23390 (30 μ g/kg, ip), rakloprid (15 μ g/kg, ip), BMY14802 lub BD1047 (odpowiednio 0,5 mg/kg lub 10 mg/kg, ip) [5]. Badania te wykazały, że pobudzenie receptora opioidowego δ przez rubiskolinę-6 indukuje aktywację mechanizmu zależnego od receptora σ_1 , wzбудzając uwalnianie dopaminy i stymulację receptora dopaminy (D_1) [5, 22].

Działanie przeciwdepresyjne

Wiele badań potwierdza związek układu opioidowego z działaniem determinującym nastrój, dlatego możliwe działanie przeciwdepresyjne rubiskoliny-6 przebadali Mitsumoto i wsp. w teście behawioralnym na modelu zwierzęcym badającym zachowania depresyjne (TST), a także w eksperymencie określającym spontaniczną aktywność lokomotoryczną (LMA) [14]. W teście TST u zwierząt niepoddanych stresowi, rubiskolina-6 podana dootrzewnowo w dawce 30 mg/kg nie skróciła czasu bezruchu u myszy. Natomiast zastosowanie tej samej dawki, ale u myszy narażonych na dodatkowy ostry stres, spowodowało zmniejszenie czasu nieruchomości. Było to antagonizowane przez receptory opioidowe δ , bowiem podanie NTI (1 mg/kg, ip) zahamowało efekt przeciwdepresyjny peptydu. Rubiskolina-6 nie zmieniła znacząco aktywności lokomotorycznej zarówno u myszy poddanych, jak i niepoddanych stresowi, co jest zgodne z innymi badaniami wykazującymi, że klasyczne leki przeciwdepresyjne nie wpływają lub tylko nieznacznie hamują aktywność motoryczną.

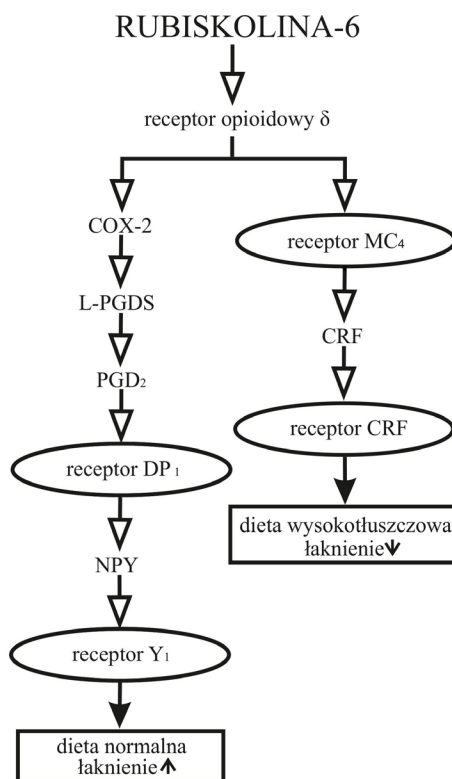
WPLYW RUBISKOLIN NA REGULACJĘ PRZYJMOWANIA POKARMU

Działanie pobudzające łaknienie

Rubiskolina-6 może również stymulować łaknienie przez aktywowanie receptorów opioidowych δ umiejscowionych w OUN. Potwierdziły to badania, w których rubiskolina-6 podawana *icv* w dawce 1–30 nmol/zwierzę, pobudziła łaknienie u myszy niegłodzonych, a efekt

ten był obserwowany w ciągu 120 minut [10, 12, 17]. Po podaniu *ip* w dawce 0,1–0,3 mg/kg, peptyd również wykazywał działanie oreksygenne. W przeciwieństwie do innych endogennych neuropeptydów, takich jak: NPY, grelina czy oreksyna, rubiskolina-6 była również aktywna po podaniu doustnym, a jej minimalna skuteczna dawka wynosiła 0,3 mg/kg [4].

Podsumowując, rubiskolina-6 silnie stymuluje pobieranie pokarmu po podaniu doustnym i jest to związane z pobudzeniem receptorów opioidowych δ w OUN. Ponadto potwierdzono, że w mechanizmie działania oreksygennego bierze udział także COX-2, odpowiedzialna za syntezę prostanoidów oraz L-PGDS, biorąca udział w powstawaniu PGD₂. Otrzymana w tym szlak sygnalowym cząsteczka PGD₂ wiąże się ze swoim receptorem DP₁, który stymuluje NPY i jego układ receptory Y₁ w podwzgórzu (ryc. 3) [10, 12, 17].



Ryc. 3. Schemat działania rubiskoliny-6 po podaniu doustnym w regulacji łaknienia, na podstawie [11, 17]

Kaneko i wsp. [10] wysunęli hipotezę opartą na niepublikowanych danych, mówiącą o braku udziału receptorów σ_1 i D1 w aktywności oreksygenicznnej rubiskoliny-6, które są kluczowe w jej działaniu przeciwlękowym i wpływającym na konsolidację pamięci [5, 20].

Badania opisane przez Miyazaki i wsp. [15] wykazały, że rubiskolina-6 podana myszom (1 mg/kg, doustnie)

w podeszłym wieku (>2 lat), wykazującym oporność na grelinę, pobudziła ich łaknienie, co sugerowało rolę receptorów opioidowych, a nie NPY i greliny w mechanizmie regulującym pobór pokarmu. Odkrycie to może mieć potencjalne zastosowanie w leczeniu jadłowstrętu u osób w podeszłym wieku.

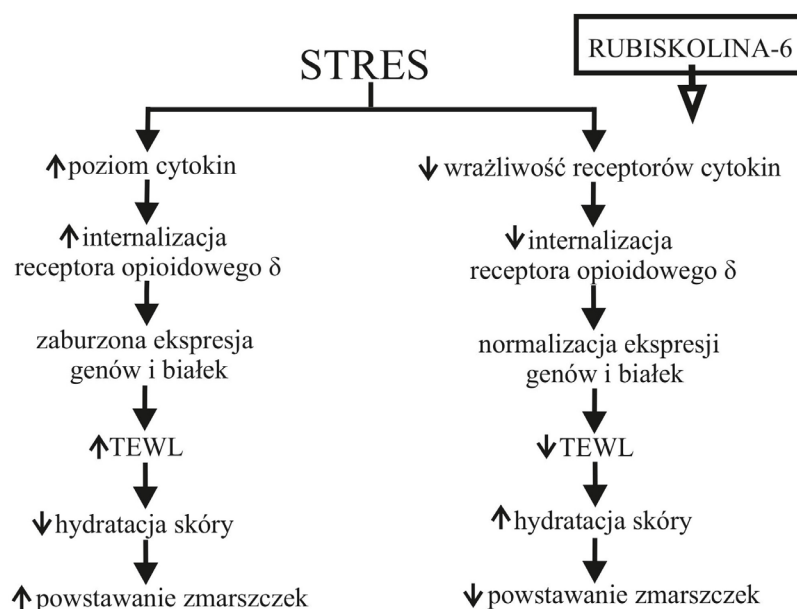
Działanie hamujące łaknienie

Aktywacja receptorów opioidowych w OUN nie tylko zwiększa łaknienie przy prawidłowej/zbilansowanej diecie, ale może zmniejszać spożycie wysokotłuszczowej diety, co prawdopodobnie jest związane ze szlakiem melanokortynowym sprzężonym z działaniem czynnika uwalniającego CRF [11]. Rubiskolina-6 (0,39–3,9 $\mu\text{mol/kg}$, doustnie) hamowała spożycie wysokotłuszczowego pokarmu przez myszy, a efekt ten był blokowany przez podanie NTI (10 nmol/zwierzę, icv), co potwierdza udział receptorów opioidowych δ . Działanie anoreksygenne w przypadku diety wysokotłuszczowej zniesione było przez podanie inhibitora (HS024, 1 nmol/zwierzę, icv) receptora melanokortyny 4 (MC_4), co potwierdzało udział MC_4 w działaniu indukowanym przez agonistów receptora opioidowego δ (ryc. 3) [11].

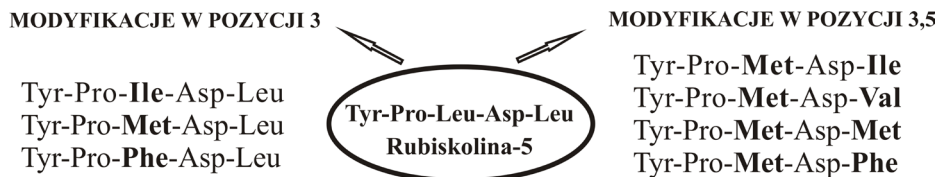
Działanie regulujące homeostazę glukozy

Niektóre badania wyjaśniają również rolę receptorów opioidowych w regulacji homeostazy glukozy, m.in. wpływ na jej wychwyt z osocza oraz natężenie glukoneogenezy w wątrobie. Dlatego Kairupa i wsp. podjęli się badania wpływu rubiskoliny-6 na wychwyt glukozy w mięśniach szkieletowych [9]. W modelu *in vitro* wykorzystano dwie prawidłowe mięśniowe linie komórkowe:

L6 – szczurze prawidłowe mioblasty mięśni szkieletowych i C2C12 – mysie prawidłowe mioblasty mięśni szkieletowych. W modelu *in vivo* użyto szczury z cukrzycą indukowaną STZ. Rubiskolina-6 wywołała zależne od stężenia zwiększenie wychwyty glukozy, wykazując maksymalną odpowiedź przy dawce 1 μM w obydwu liniach komórkowych. Działanie takie było całkowicie zablokowane przez nalokson, antagonistę receptorów opioidowych, ale tylko częściowo hamowane przez selektywnych antagonistów receptorów opioidowych μ i δ , odpowiednio naloksonazynę i NTI, co sugerowało istnienie zależności między receptorami opioidowymi, choćby przez ich wzajemną aktywację lub dimeryzację. Wzrost wychwyty glukozy indukowany przez rubiskolinę-6 powiązано z interakcją z podjednostką $\text{G}\alpha_{q/11}$, czego skutkiem była aktywacja wewnątrzkomórkowej PLC. Stymulacja wychwyty glukozy zniesiona była z udziałem szlaku AMPK, bowiem podanie inhibitora sygnału, peptydu C, zahamowało proces. Analiza stężenia białka metodą western blot potwierdziła, że w obydwu liniach komórkowych rubiskolina-6 spowodowała wzrost ekspresji pAMPK (ufosforylowanej kinazy), podobnie to działanie było zahamowane w wyniku preinkubacji z antagonistami receptorów opioidowych i inhibitorami szlaków sygnałowych powiązanych z podjednostką $\text{G}\alpha_{q/11}$ i PLC. Wykazano również, że stymulacja mioblastów rubiskoliną-6 zwiększyła stężenie GLUT4 we frakcji błonowej, co wynikało z aktywacji AMPK i było przekazywane szlakiem niezależnym od insuliny. Rubiskolina-6 podana dootrzewnowo w dawce 30 mg/kg i 100 mg/kg znormalizowała zachowania żywieniowe i znacznie zmniejszała stężenie glukozy we krwi u szczurów z cukrzycą indukowaną STZ. Analiza western blot potwierdziła znaczny wzrost GLUT4 w mięśniach szkieletowych szczurów z indukowaną cukrzycą,



Ryc. 4. Schemat działania rubiskoliny-6 w wyniku działania bodźca stresowego, na podstawie [4]



Ryc. 5. Analogi rubiskoliny-5

czego nie obserwowano w grupie szczurów bez cukrzycy. Wpływ rubiskoliny-6 został zniesiony w wyniku podania naloksonu w grupie zwierząt indukowanych STZ.

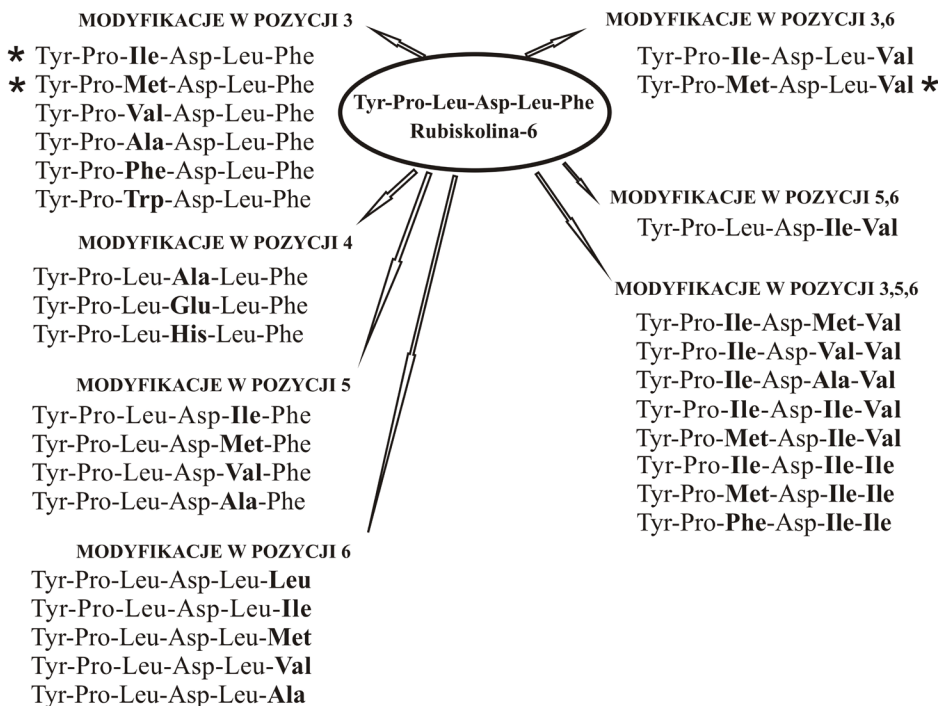
WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWZAPALNE I PRZECIWSZARZENIOWE RUBISKOLIN

Istnieje coraz więcej dowodów na to, że receptory opioidowe i ich ligandy biorą udział w utrzymaniu homeostazy w warunkach prawidłowych i stresowych (zapalnych) komórek naskórka. Badania *in vitro* i *in vivo* [4] wykazały, iż rubiskolina-6 zmniejsza stany zapalne skóry, poprawia różnicowanie komórek naskórka i kondycję skóry. Ponadto wykazuje zdolność do hamowania syntezy i uwalniania mediatorów prozapalnych oraz przyczynia się do normalizacji ekspresji genów i wytwarzania białek, m.in. odpowiedzialnych za integralność i funkcjonalność naskórka. Co więcej, krem z dodatkiem rubiskoliny-6 przywrócił prawidłową strukturę bariery skórnej w grupie kobiet między 40. a 65. rokiem życia. Odbudował jej gładkość o 30%, znacząco zredukował zmarszczki okołoooczodołowe i okołowierzchołkowe (wokół jamy ustnej) o 58% oraz zaha-

mował TEWL aż o 82%, w porównaniu z grupą placebo. Oznacza to, że wspomniane właściwości przeciwstarzeniowe rubiskoliny-6 są zachowane dzięki hamowaniu stanu zapalnego oraz regulacji różnicowania się komórek naskórka i poprawy funkcji bariery skórnej (ryc. 4).

ANALOGI RUBISKOLIN

Dotąd podjęto się syntezy kilkudziesięciu analogów rubiskolin w celu poszukiwania związków o lepszym niż macierzyste peptydy profilu farmakologicznym [20]. Dla wszystkich pochodnych przeprowadzono badanie względnego powinowactwa do receptorów opioidowych z użyciem preparatów błonowych, ale również test na izolowanych tkankach zwierzęcych, GPI oraz MVD. Spośród analogów rubiskoliny-5, zmodyfikowanych w pozycji 3 przez wstawienie Ile, Met oraz Phe (ryc. 5), największe powinowactwo do receptorów opioidowych δ wykazał związek Tyr-Pro-Met-Asp-Leu, dlatego poddano go dalszym zmianom strukturalnym w obrębie C-końca. Zaprojektowano analogi, w których Leu w pozycji 5 została zastąpiona przez Ile, Val, Met, Phe. Najlepszym związkiem z tej grupy był Tyr-Pro-Met-Asp-Ile.



Ryc. 6. Analogi rubiskoliny-6 (* oznaczono analogi wyselekcjonowane do badań *in vivo*)

Pochodne rubiskoliny-6 zmodyfikowane wyłącznie w obrębie pojedynczej pozycji podzielono na 4 serie, w każdej z nich zmieniony był aminokwas odpowiednio w pozycji 3,4,5,6 sekwencji liniowej (ryc. 6), przy zachowaniu uprotonowanej Tyr na N-końcu i reszty Pro w pozycji 2, które to aminokwasy są odpowiedzialne za własności biologiczne. Związkami o większym niż peptyd macierzysty powinowactwie do receptorów opioidowych δ , były Tyr-Pro-Ile-Asp-Leu-Phe oraz Tyr-Pro-Met-Asp-Leu-Phe. Spośród analogów zmienionych w więcej niż jednej pozycji, najlepszy był peptyd o sekwencji Tyr-Pro-Met-Asp-Leu-Val. Analiza metodą QSAR z wykorzystaniem porównawczych analiz CoMFA i CoMSIA potwierdziła, że najkorzystniejszą zmianą sekwencji rubiskolin, było wprowadzenie Met w pozycji 3, aminokwasu wnoszącego hydrofilowy atom w pozycji δ łańcucha bocznego i hydrofobowy atom na zewnątrz [2].

Wyselekcjonowane na podstawie badań *in vitro* najlepsze analogi rubiskoliny-6 zostały przebadane pod kątem ich właściwości przeciwbólowych na myszach, w teście „tail pinch” [20]. Badanie właściwości przeciwbólowych było przeprowadzone dla trzech analogów, które miały największe powinowactwo do receptora δ (ryc. 6, oznaczone*). Peptydy były badane w dawce 3 nmol/zwierzę po podaniu icv i wykazały aktywność przeciwbólową, silniejszą niż rubiskolina-6, ale mniejszą niż selektywny δ -agonista DPDPE. Analogi wykazały maksymalną odpowiedź w ciągu 5 min od podania, a czas trwania efektu wynosił około 20-30 min. Efekt przeciwbólowy badanych peptydów był hamowany

przez jednoczesne podanie NTI w dawce 1 mg/kg podskórnie, co świadczyło o udziale receptorów opioidowych δ w przekazywaniu działania analgetycznego badanych peptydów. Najlepszym analogiem w serii był prawie 20 razy aktywniejszy niż rubiskolin-6, peptyd o sekwencji Tyr-Pro-Met-Asp-Leu-Val. Jego aktywność prawdopodobnie wynikała z obecności Asp w pozycji 4, alifatycznej reszty Met w pozycji 3 i hydrofobowego C-końca.

PODSUMOWANIE

RuBisCO, jako jedno z najbardziej rozpowszechnionych w królestwie roślin białek, stało się przedmiotem różnych badań, dotyczących jego właściwości i możliwości zastosowania do potrzeb rolnictwa i przemysłu żywnościowego. Enzym ten, to jednocześnie prekursor wyizolowanych w 2001 r. δ -selektywnych rubiskolin, wykazujących aktywność przeciwbólową po podaniu doustnym. Podczas gdy większość peptydów działających przez receptory opioidowe, to łatwo rozkładane przez enzymy proteolityczne związki, rubiskoliny wydają się odporne na degradację. W związku z tym rubiskolina-6 prawdopodobnie przenika przez barierę krew-mózg lub wykorzystuje szlaki sygnałowe z obwodowego układu nerwowego, by w ten sposób aktywować receptory opioidowe w OUN. To, że rubiskolina-6 podawana doustnie wykazywała właściwości przeciwdepresyjne, przeciwłękowe, jak również stymulowała łaknienie i aktywność usprawniającą pamięć, czyni ją bardzo obiecującym lekiem do zastosowania w nowych postaciach terapii.

PIŚMIENICTWO

- [1] Bartoszewski R., Łacmańska I., Króliczewski J., Szczepaniak A.: The characteristic of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase(rubisco). Directions of studies. Postepy Biochem., 2003; 49: 116–124
- [2] Caballero J., Saavedra M., Fernández M., González-Nilo F.D.: Quantitative structure-activity relationship of rubiscolin analogues as δ opioid peptides using comparative molecular field analysis (CoMFA) and comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA). J. Agric. Food Chem., 2007; 55: 8101–8104
- [3] Cassell R.J., Mores K.L., Zervas B.L., Mahmoud A.H., Lill M.A., Trader D.J., van Rijn R.M.: Rubiscolins are naturally occurring G protein-biased delta opioid receptor peptides. Eur. Neuropsychopharmacol., 2019; 29: 450–456
- [4] Hajra H., Amstutz B., Schweikert K., Auriol D., Redziniak G., Lefèvre F.: Opioid receptor delta as a global modulator of skin differentiation and barrier function repair. Int. J. Cosmet. Sci., 2015; 37: 386–394
- [5] Hirata H., Sonoda S., Agui S., Yoshida M., Ohinata K., Yoshikawa M.: Rubiscolin-6, a δ opioid peptide derived from spinach Rubisco, has anxiolytic effect via activating σ_1 and dopamine D_1 receptors. Peptides, 2007; 28: 1998–2003
- [6] Janecka A., Fichna J., Janecki T.: Opioid receptors and their ligands. Curr. Top. Med. Chem., 2004; 4: 1–17
- [7] Janecka A., Perlikowska R., Gach K., Wyrebska A., Fichna J.: Development of opioid peptide analogs for pain relief. Curr. Pharm. Des., 2010; 16: 1126–1135
- [8] Janecka A., Staniszevska R., Fichna J.: Endomorphin analogs. Curr. Med. Chem., 2007; 14: 3201–3208
- [9] Kairupan T.S., Cheng K.C., Asakawa A., Amitani H., Yagi T., Ataka K., Rokot N.T., Kapantow N.H., Kato I., Inui A.: Rubiscolin-6 activates opioid receptors to enhance glucose uptake in skeletal muscle. J. Food Drug Anal., 2019; 27: 266–274
- [10] Kaneko K., Lazarus M., Miyamoto C., Oishi Y., Nagata N., Yang S., Yoshikawa M., Aritake K., Furuyashiki T., Narumiya S., Urade Y., Ohinata K.: Orally administered rubiscolin-6, a δ opioid peptide derived from Rubisco, stimulates food intake via leptomeningeal lipocallin-type prostaglandin D synthase in mice. Mol. Nutr. Food Res., 2012; 56: 1315–1323
- [11] Kaneko K., Mizushige T., Miyazaki Y., Lazarus M., Urade Y., Yoshikawa M., Kanamoto R., Ohinata K.: δ -Opioid receptor activation stimulates normal diet intake but conversely suppresses high-fat diet intake in mice. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2014; 306: R265–R272
- [12] Kaneko K., Yoshikawa M., Ohinata K.: Novel orexigenic pathway prostaglandin D2-NPY system – involvement in orally active orexigenic δ opioid peptide. Neuropeptides, 2012; 46: 353–357
- [13] Kastin A.J.: Handbook of Biologically Active Peptides. 2nd ed. Academic Press, 2013
- [14] Mitsumoto Y., Sato R., Tagawa N., Kato I.: Rubiscolin-6, a δ -opioid peptide from spinach RuBisCO, exerts antidepressant-like effect in restraint-stressed mice. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 2019; 65: 202–204
- [15] Miyazaki Y., Kaneko K., Iguchi S., Mizushige T., Kanamoto R., Yoshikawa M., Shimizu T., Ohinata K.: Orally administered δ opioid agonist peptide rubiscolin-6 stimulates food intake in aged mice with ghrelin resistance. Mol. Nutr. Food Res., 2014; 58: 2046–2052

- [16] Nasehi M., Kafi F., Zarrindast M.R.: Differential mechanisms of opiodergic and dopaminergic systems of the ventral hippocampus (CA₃) in anxiolytic-like behaviors induced by cholestasis in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 2013; 714: 352–358
- [17] Ohinata K., Takagi K., Biyajima K., Fujiwara Y., Fukumoto S., Eguchi N., Urade Y., Asakawa A., Fujimiya M., Inui A., Yoshikawa M.: Central prostaglandin D₂ stimulates food intake *via* the neuropeptide Y system in mice. *FEBS Lett.*, 2008; 582: 679–684
- [18] Perlikowska R., Janecka A.: Rubiscolins – highly potent peptides derived from plant proteins. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2018; 18: 104–112
- [19] Raehal K.M., Walker J.K., Bohn L.M.: Morphine side effects in β -arrestin 2 knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005; 314: 1195–1201
- [20] Yang S., Kawamura Y., Yoshikawa M.: Effect of rubiscolin, a δ opioid peptide derived from Rubisco, on memory consolidation. *Peptides*, 2003; 24: 325–328
- [21] Yang S., Yunden J., Sonoda S., Doyama N., Lipkowski A.W., Kawamura Y., Yoshikawa M.: Rubiscolin, a δ -selective opioid peptide derived from plant Rubisco. *FEBS Lett.*, 2001; 509: 213–217
- [22] Yoshikawa M.: Bioactive peptides derived from natural proteins with respect to diversity of their receptors and physiological effects. *Peptides*, 2015; 72: 208–225

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.