

MAREK SKRZYPSKI^{1,2}, MATHIAS Z. STROWSKI², KRZYSZTOF W. NOWAK¹

¹*Katedra Fizjologii i Biochemii Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wołyńska 35. 60-637 Poznań*

²*Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie
Interdisziplinäres Stoffwechsel-Centrum: Endokrinologie
Diabetes und Stoffwechsel
Charite Universitätsmedizin Berlin, 13353 Berlin
E-mail: Marek.Skrzypski@charite.de
Mathias.Strowski@charite.de
kwnowak@up.poznan.pl*

OREKSYNY W REGULACJI HOMEOSTAZY ENERGETYCZNEJ

Choroby cywilizacyjne stanowią gwałtownie narastający problemem, który w głównej mierze dotyka społeczeństw z krajów wysoko rozwiniętych. Przykładem takich chorób są cukrzyca typu 2, otyłość czy rosnąca zapadalność na nowotwory. Podłoże oraz skuteczna terapia tych nieprawidłowości w funkcjonowaniu organizmu, w większym lub mniejszym stopniu ciągle pozostają nierozwiązane, pomimo intensywnego rozwoju nauk biomedycznych. Jednym z bardziej obiecujących obszarów w tym zakresie są prace, które w ostatnich latach doprowadziły do identyfikacji szeregu nowych hormonów peptydowych oraz ich receptorów. Wydaje się, że wiele z

nowopoznanych peptydów odgrywa istotną rolę w szeroko pojętej regulacji homeostazy energetycznej czy procesie nowotworzenia.

Niniejsza praca koncentruje się na fizjologii dwóch neurohormonów, oreksyn A i B oraz ich receptorów, ze szczególnym naciskiem na ich rolę w regulacji homeostazy energetycznej. Przedstawiono rezultaty ponad dziesięcioletnich badań nad oreksynami i ich receptorami, z uwzględnieniem oddziaływań na poziomie ośrodkowego układu nerwowego oraz podkreślono rolę oreksyn w endokrynej regulacji metabolizmu tkanek obwodowych.

CHARAKTERYSTYKA OREKSYN I ICH RECEPTORÓW

Na początku 1998 r., dwie grupy badawcze, pracujące niezależnie i stosując odmienne metody biologii molekularnej, odkryły i scharakteryzowały dwa nieznane wcześniej hormony peptydowe. De Laceda i jego grupa, analizując bibliotekę cDNA podwzgórza szczura, zidentyfikowali mRNA kodujące białko prekursorowe, z którego na drodze proteolitycznej obróbki powstają dwa neuropeptydy. Peptydy te zostały określone jako hipokretyny 1 i 2. Nazwa ta bezpośrednio nawiązuje do miejsca identyfikacji jakim było

podwzgórze (ang. hypothalamus) oraz strukturalnego podobieństwa odkrytych peptydów do hormonów z rodziny inkretyn (ang. incretin) (DE LECEA i współaut. 1998). Druga grupa, kierowana przez Sakurai'ego, te same neurohormony odkryła poszukując naturalnych ligandów dla receptorów sierocych związanych z białkami G (ang. G protein-coupled receptors, GPCR). Ze względu na oreksygeny, czyli stymulujący łaknienie efekt nowoodkrytych neuropeptydów (gr. *orexis* = apetyt), nazwano je oreksynami A i B (SAKU-

RAI i współaut. 1998). Należy zaznaczyć, że obie nazwy są używane w piśmiennictwie i są poprawne.

Oreksyny A i B powstają w wyniku proteolitycznej obróbki wspólnego 130 aminokwasowego białka prekursorowego – preprooreksyny. U człowieka formy A i B zbudowane są odpowiednio z 33 i 28 aminokwasów i wykazują 46% podobieństwa sekwencji aminokwasowej. W wyniku potranslacyjnej obróbki, w rejonie końca-N łańcucha polipeptydowego oreksyny A powstaje cykliczny pyroglutamyl, a oba peptydy ulegają amidacji na końcu-C. Ponadto, w łańcuchu polipeptydowym oreksyny A, pomiędzy resztami Cys6-Cys12 oraz Cys7-Cys14, znajdują się dwa mostki dwusiarczkowe. Częsteczka oreksyny A wykazuje bardziej lipofilny charakter, co decyduje o większej stabilności w płynie mózgoworodzeniowym oraz krwi. Co więcej, w przeciwieństwie do oreksyny B, oreksyna A pokonuje barierę krew-mózg. Właściwości te sprawiają, że oreksyna A wykazuje silniejsze działanie biologiczne niż liniowa, krótsza i mniej stabilna oreksyna B. Oreksyny charakteryzuje bardzo silny konserwatyzm międzygatunkowy; sekwencja aminokwasowa peptydów u człowieka, szczura, myszy, świni i bydła jest w 100% identyczna. Ekspresja genu preprooreksyny w ośrodkowym układzie nerwowym zachodzi w stosunkowo niewielkiej liczbie neuronów w rejonie bocznego i tylnego podwzgórza, natomiast neurony te tworzą rozległy system docierający do takich obszarów jak kora mózgowa, hipokamp, wzgórze, pień mózgu czy rdzeń kręgowy (SMART i JERMAN 2002).

Oreksyny wpływają na komórki docelowe przez aktywację dwóch typów receptorów, nazwanych odpowiednio OXR1 oraz OXR2. Spotkać można się również w literaturze z drugim nazewnictwem, nawiązującym do określenia hipokretyny, to jest Hcrtr 1 i 2. Receptory oreksyn są zbudowane z 7 domen transbłonowych i należą do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G. U człowieka podobieństwo w budowie aminokwasowej OXR1 i OXR2 wynosi 64%. Podobnie do oreksyn, również w przypadku receptorów, sekwencja aminokwasowa jest u ssaków wysoce konserwatywna. Podobieństwo pomiędzy szczurem a człowiekiem wynosi 94% dla OXR1 i 95% dla OXR2. Wykazano, że oreksyna A wiąże się z jednakowym powinowactwem do obydwu typów receptora, natomiast oreksyna B wiąże się z dru-

gim typem receptora około 10 razy silniej niż z typem pierwszym (SAKURAI i współaut. 1998). Dlatego przyjmuje się, że OXR1 jest receptorem selektywnym dla oreksyny A, natomiast OXR2 nieselektywnie wiąże obydwa neuropeptydy. Mechanizm transdukcji sygnału receptora jest stosunkowo dobrze poznany. W neuronach bocznego podwzgórza oraz w komórkach wykazujących stabilną ekspresję OXR1, oreksyny powodują wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia (Ca^{2+}). Napływ jonów wapnia może być związany z aktywacją kanałów wapniowych sterowanych napięciem lub temperaturą. W transfekowanych komórkach jajnika chomika chińskiego (CHO) zauważono, że stymulowany oreksyną wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia zachodzi przez jego uwalnianie z magazynów wewnątrzkomórkowych, a efekt ten związany jest z aktywacją fosfolipazy C. Z drugiej strony, zmiana stężenia jonów wapnia może być wynikiem ich napływu do komórki w wyniku aktywacji kinazy białkowej C. Wykazano również, że receptory oreksyn, w wyniku aktywacji cyklicznej adenylanowej, jako wtórny przekaznik mogą wykorzystywać również cykliczny AMP (cAMP) (SMART i JERMAN 2002). W badaniach na komórkach HEK293, transfekowanych dla uzyskania stabilnej ekspresji OXR2 wykazano, że zarówno oreksyna A, jak i B aktywują kaskadę kinaz z grupy MAP (kinazy aktywowane mitogenami) (AMMOUN i współaut. 2006). Podobne rezultaty otrzymano w badaniach na komórkach nadnerczy (RAMANJANEYA i współaut. 2009). Dlatego oreksyny najprawdopodobniej odgrywają pewną rolę w takich procesach komórkowych jak apoptoza czy proliferacja. Należy jednak podkreślić, że mechanizm transdukcji sygnału hormonalnego jest zależny od miejsca działania, co znajduje odzwierciedlenie w różnych efektach biologicznych. Po części tłumaczy się to również tym, że pierwszy i drugi typ receptora wykorzystują różne białka G. OXR1 jest selektywnie sprzężony z białkami z podklasy $G_{q/11}$, natomiast OXR2 może wykorzystywać białka $G_{q/11}$, ale również $G_{i/o}$. Ekspresje OXR1 odnotowano głównie w obszarze bocznego podwzgórza, jądrze brzuszno-przyśrodkowym, jądrze miejsca sinawego, hipokampie, przysadce i szyszynce. OXR2 swoją ekspresję obejmuje głównie jądra przykomorowe, brzuszno-przyśrodkowe, grzbietowo-przyśrodkowe, łukowate oraz korę i pień mózgu (BEUCKMANN i YANAGISAWA 2002).

ROLA W REGULACJI BEHAVIORU POKARMOWEGO

Oreksyny zostały zidentyfikowane w małej populacji neuronów w obszarze bocznego podwzgórza, regionie klasycznie postrzeganym jako ośrodek głodu. Aktywność neuronów, w których zachodzi ekspresja oreksyn jest precyzyjnie regulowana przez glukozę. Podobnie jak neurony syntetyzujące, zidentyfikowane wcześniej hormony oreksygenne, takie jak NPY (neuropeptyd Y) czy AgRP (białko z rodziny Agouti), należą one do grupy hormonów, których aktywność jest hamowana przez glukozę. Lokalizacja oraz projekcja neuronów syntetyzujących oreksynę do innych obszarów mózgu, kluczowych w regulacji behawioru pokarmowego, takich jak jądro łukowate, nasunęła przypuszczenia, że oreksyny mogą być zaangażowane w regulację pobierania pokarmu i homeostazy energetycznej. Rzeczywiście, pierwsze badania potwierdziły tę hipotezę, ukazując oreksyny jako peptydy silnie stymulujące pobieranie pokarmu. Wykazano, że u szczura i myszy dokomorowe podanie oreksyny A, w mniejszym stopniu oreksyny B, w fazie jasnej, kiedy zwierzęta z natury są nieaktywne, dawko- zależnie zwiększa ilość pobieranego pokarmu (SAKURAI i współaut. 1998, SWEET i współaut. 1999). Prawdopodobnie kluczową rolę odgrywa w tym procesie pierwszy typ receptora, ponieważ wykazano, że jego farmakologiczna inhibicja powoduje spadek bazalnego oraz indukowanego przez podanie oreksyny A pobierania pokarmu (RODGERS i współaut. 2002). Z drugiej strony, pełna charakterystyka oreksyn oraz ich receptorów w regulacji łaknienia nie jest całkowicie jasna. Stymulujący pobieranie pokarmu wpływ oreksyn utrzymuje się tylko przez kilka pierwszych godzin, natomiast chroniczne podawanie oreksyn przez 24 godziny nie ma żadnego wpływu na behawior pokarmowy i masę ciała. Co więcej, u szczurów starych (25 miesięcy) oreksyna również nie wpływa znacząco na ilość pobieranego pokarmu. Efekt ten tłumaczy się malejącą z wiekiem ekspresją receptorów oreksyn w podwzgórzu (SMART i JERMAN

2002, TAKANO i współaut. 2004). Wiadomo również, że neurony syntetyzujące oreksynę są w znacznym stopniu regulowane przez aktualny status energetyczny organizmu. Ekspresja genu preprooreksyny oraz receptorów oreksyn wzrasta znacząco na skutek głodzenia, hiperlipidemii czy, indukowanej przewlekłym podawaniem insuliny, hipoglikemii. Obniżony poziom mRNA preprooreksyny w podwzgórzu zaobserwowano natomiast w doświadczeniach z użyciem zwierzęcych modeli cukrzycy i otyłości. Pełną i przejrzystą charakterystykę systemu oreksynowego w regulacji pobierania pokarmu i masy ciała utrudnia to, że neurony, w których zachodzi ekspresja oreksyn oraz ich receptorów wykazują interakcję z neuronami charakterystycznymi dla innych istotnych w tych procesach peptydów, takich jak grelina, NPY, AgRP czy POMC (proopiomelanokortyna). Obserwuje się również koekspresję receptorów oreksyn, leptyny czy NPY. Prawdopodobnie oreksyny indukując łaknienie wykorzystują w pewnym zakresie NPY, z drugiej strony, oreksyny pośredniczą w pobieraniu pokarmu indukowanym greliną (TOSHINAI i współaut. 2003, MAZZA i współaut. 2005). Konkludując, aktualnie dominuje pogląd, że oreksyny regulują pobieranie pokarmu, jednak ich rola jest mniej znacząca niż wpływ innych oreksygennych peptydów, jak na przykład NPY. Sugeruje się również, że w znacznej mierze może to być efekt pośredni, wynikający ze stymulowanej oreksynami większej aktywności motorycznej zwierząt i wydłużenia okresu czuwania. Co więcej, ostatnio wykazano, że podanie agonisty selektywnie aktywującego OXR2 nie zmienia behawioru pokarmowego u zwierząt utrzymywanych na diecie normalnej i dosyć nieoczekiwanie hamuje pobieranie pokarmu podczas podawania paszy wysokotłuszczowej (FUNATO i współaut. 2009). Dlatego dokładne wyjaśnienie roli receptorów oreksyn w regulacji pobierania pokarmu wymaga kolejnych badań, z naciskiem na scharakteryzowanie ich roli w różnych stanach metabolicznych.

SYSTEM OREKSYNOWY ORAZ JEGO ZABURZENIA W REGULACJI BILANSU ENERGETYCZNEGO

Dostępne dane dostarczają dowodów na to, że jednym z kluczowych mechanizmów zaangażowanych w regulację homeostazy

energetycznej przez oreksyny jest ich udział w regulacji wydatkowania energii oraz cyklu sen-czuwanie. Ekspresja genów preproorek-

syny oraz receptorów oreksyn w znacznym stopniu zachodzi w neuronach zlokalizowanych w obszarach mózgu regulujących te procesy. Co więcej, aktywność neuronów oreksynowych wzrasta w czasie czuwania i aktywności zwierząt, natomiast jest wyhamowana podczas wypoczynku czy snu (BEREZINSKA i ZAWILSKA 2007). Wykazano, że dokomorowe podanie oreksyn powoduje wzrost aktywności ruchowej, stymuluje pracę układu sercowo-naczyniowego, podwyższa temperaturę ciała i zwiększa zużycie tlenu, konsekwentnie promując ujemny bilans energetyczny. Co więcej, oreksyny podawane dokomorowo powodują również ograniczenie fazy REM snu (NUNEZ i współaut. 2009). Zaangażowanie systemu oreksynowego w regulacji fizjologii snu podkreślają badania ukazujące związek pomiędzy kilkoma mutacjami w obrębie genu kodującego OXR2 a występowaniem narkolepsji u psów. Potwierdziły to kolejne badania wykazujące, że nokaut OXR2 u psa lub preprooreksyny u szczura manifestuje się podobnie do ludzkiej narkolepsji (BEUCKMANN i YANAGISAWA 2002). U ludzi i zwierząt narkolepsja jest chorobą neurologiczną, objawiającą się głównie napadowymi stanami senności, katalepsią, porażeniem przysennym, ale również bardzo często manifestuje się zwiększonym indeksem masy ciała (BMI) i ograniczonym wydatkowaniem energii, co więcej udokumentowano, że narkoleptycy znacznie częściej zapadają na cukrzycę typu drugiego (LONGSTRETH i współaut. 2007). W świetle aktualnej wiedzy wydaje się, że istotnym ogniwem łączącym narkolepsję, otyłość i predyspozycje w kierunku rozwoju cukrzycy typu 2 mogą być zaburzenia w obrębie oreksyn oraz ich receptorów. Silnym argumentem wspierającym tę hipotezę są wyniki badań ukazujące, że pacjenci cierpiący z powodu narkolepsji charakteryzują się niższym poziomem oreksyny A w płynie mózgowo-rdzeniowym (NISHINO i KANBAYASHI 2005). Idąc dalej, niższy poziom

oreksyny A zauważono również w krwi u ludzi otyłych (ADAM i współaut. 2002). Ujemna korelacja pomiędzy indeksem masy ciała a poziomem oreksyny A oraz diabetyczne predyspozycje obserwowane u narkoleptyków zasugerowały, że oreksyna A może odgrywać kluczową rolę w homeostazie energetycznej całego organizmu. Przypuszczenia te potwierdzają wyniki uzyskane przy użyciu genetycznie modyfikowanych myszy, niezdolnych do ekspresji genu preprooreksyny. Myszy te, oprócz symptomów typowych dla narkolepsji, są mniej aktywne i dodatkowo charakteryzuje je umiarkowana otyłość (HARA i współaut. 2005). Wydaje się, że oreksyny, promując wydatkowanie energii i ujemny bilans energetyczny, działają prewencyjnie w kierunku zmniejszenia masy ciała. Argumentem potwierdzającym te przypuszczenia jest fakt, że u myszy utrzymywanych na diecie wysokotłuszczowej podanie selektywnego agonisty OXR2 powoduje redukcję masy ciała (FUNATO i współaut. 2009). Z drugiej strony, niedobór oreksyn czy zaburzenia w obrębie ich receptorów, przejawiają się dodatnim bilansem energetycznym przyczyniając się do powstawania otyłości, co może skutkować rozwojem insulinooporności i cukrzycy typu 2. Dokładny mechanizm wykorzystywany przez receptory oreksyn w regulacji wydatkowania energii nie jest w pełni poznany. Po części istotną rolę może tu odgrywać stymulujący wpływ oreksyn na współczulny układ nerwowy oraz aktywność motoryczną (SHIUCHI i współaut. 2009). Z drugiej strony zademonstrowano, że aktywność motoryczna nie musi być powodem promowanego przez oreksyny zwiększenia wydatkowania energii, ponieważ podobne efekty metaboliczne mają miejsce u szczurów w czasie anestezji (WANG i współaut. 2001). Najnowsze wyniki jasno sugerują, że kluczowa może być tutaj rola systemu oreksynowego w regulacji insulino-wrażliwości oraz metabolizmie glukozy.

POWIĄZANIA Z INSULINĄ I METABOLICZNE KONSEKWENCJE ICH ZABURZEŃ

Interesujące w tym zakresie wyniki uzyskano w badaniach na myszach z nokautem genu preprooreksyny. Myszy te wraz z wiekiem wykazują nietolerancję glukozy, insulinooporność i podwyższoną masę ciała (TSUNEKI i współaut. 2008). Poszukując podłoża tych zmian zaobserwowano, że orek-

syna w znacznym stopniu wpływa na utrzymanie insulino-wrażliwości, bezpośrednio na poziomie transdukcji sygnału receptora insuliny w mózgu. W podwzgórzach myszy niezdolnych do ekspresji oreksyn zaobserwowano podwyższony poziom serynowej fosforylacji kinazy białkowej B (ang. protein kinase B,

PKB), ponadto wykazano również upośledzenie funkcji insuliny w zakresie fosforylacji tyrozynowej. Dodatkowo, podobne zmiany w poziomie fosforylacji syntazy glikogenu 3b (GSK3b) odnotowano w podwzgórzu, mięśniach oraz wątrobie. Przeniesienie sygnału insuliny i jego metaboliczne konsekwencje następują głównie w wyniku aktywacji szlaków 3-kinazy fosfatydylinozytolu/kinaza białkowa B (PI3-K/PKB). Prawidłowe utrzymanie tego systemu jest istotne nie tylko w insulinozależnych tkankach obwodowych, ale również w podwzgórzu. Jego prawidłowe funkcjonowanie w podwzgórzu jest niezbędne do pełnych fizjologicznych efektów insuliny, szczególnie w zakresie hamowania wątrobowej glukoneogenezy. W badaniach na myszach wykazano, że upośledzenie tego systemu w mózgu skutkuje otyłością i umiarkowaną insulinoopornością w całym organizmie (GEROZISSIS 2008). Autorzy badań na myszach z nokautem genu oreksyny wysunęli hipotezę, że w sytuacji kiedy system oreksyny/receptory nie funkcjonuje prawidłowo, wraz z wiekiem dochodzi do нефizjologicznie podwyższonej fosforylacji PKB, która prowadzi do uniewrażliwienia receptora insuliny i w konsekwencji do insulinooporności. Rzeczywiście, obserwowana u myszy z nokautem oreksyny podwyższona fosforylacja serynowa PKB najprawdopodobniej odgrywa kluczową rolę w ujemnym sprzężeniu zwrotnym, polegającym na wyhamowaniu aktywności receptora insuliny i uniemożliwieniu fosforylacji w obrębie tyrozyny, powodując insulinooporność (TSUNEKI i współaut. 2010). Należy odnotować, że prawdopodobne jest, iż receptory oreksyn mogą partycypować w utrzymywaniu euglikemii, aktywując kinazę białkową C, której aktywność jest niezbędna

do hamowania syntezy glukozy w wątrobie co przeciwdziała hiperglikemii.

Droga, na której niedobór oreksyn odzwierciedla się w nieprawidłowym funkcjonowaniu i transdukcji sygnału receptora insuliny, pozostaje nieznana i wymaga dokładnego zgłębienia, natomiast wydaje się, że w warunkach fizjologicznych insulinooporność spowodowana zaburzeniami w systemie oreksyny/receptory może być po części wynikiem postępującego z wiekiem spadku ekspresji OXR1 i OXR2 w podwzgórzu. Z drugiej strony zademonstrowano, że u myszy nadekspresja preprooreksyny działa prewencyjnie na wzrost masy ciała indukowany dietą wysokotłuszczową. Dodatkowo, myszy te nie rozwijają insulinooporności i nie wykazują charakterystycznego podczas otyłości podwyższenia poziomu insuliny i leptyny. Podobne wyniki uzyskano podając selektywnego agonistę OXR2 (FUNATO i współaut. 2009). Rola OXR1 w tym zakresie nie jest w pełni jasna. Ta sama grupa badaczy wykazała, że jego wyłączenie, podobnie do nadekspresji preprooreksyny, również przeciwdziała hiperglikemii i hiperinsulinemii u zwierząt na diecie wysokotłuszczowej. Najprawdopodobniej odpowiada za to, charakterystyczny podczas deficytu OXR1, spadek pobierania pokarmu, co może przeciwdziałać hiperglikemii i wzrostowi stężenia insuliny we krwi. Konkludując, na podstawie dostępnych danych wydaje się, że kluczową rolę w zwiększaniu insulinooporności i prewencji rozwoju otyłości odgrywa drugi typ receptora. Mechanizm tego fenomenu nie jest w pełni poznany, ale pewne dowody wskazują, że może mieć on związek ze zwiększeniem wrażliwości komórek na leptynę oraz metabolizmem glukozy.

WPLYW NA HOMEOSTAZĘ GLUKOZY

Zauważono, że u myszy z cukrzycą indukowaną przy pomocy streptozotocyny, podanie oreksyn powoduje spadek poziomu glukozy we krwi (TSUNEKI i współaut. 2002). Po części efekt ten może być wynikiem aktywacji współczulnego układu nerwowego, ale ponieważ został zaobserwowany u zwierząt głodzonych, wskazuje na bezpośrednią rolę oreksyn i ich receptorów w transporcie i wewnątrzkomórkowym metabolizmie glukozy. Przypuszczenia te potwierdzają najnowsze badania na komórkach HEK293

z indukowaną stabilną ekspresją OXR1. W tych badaniach zauważono, że oreksyna A stymuluje ekspresję czynnika transkrypcyjnego HIF1 α (ang. hypoxia inducible factor 1 α) (SIKDER i KODADEK 2007). W warunkach fizjologicznych czynnik ten występuje w komórkach na bardzo niskim poziomie. Ekspresja HIF1 α drastycznie wzrasta podczas niskiej koncentracji tlenu (hipoksji); dodatkowo podwyższoną ekspresję HIF1 α obserwuje się również w komórkach nowotworowych. W sytuacji deficytu tlenowego HIF1 α aktywuje

ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w metabolizm beztlenowy komórki, takich jak pierwszy typ transportera glukozy (GLUT1), dehydrogenaza mleczanowa (LDH) czy enzymy szlaku glikolitycznego (BARDOS i ASHCROFT 2005). Rezultaty badań pokazują, że w komórkach HEK293 oreksyna A, niezależnie od stężenia tlenu, zwiększa ekspresję i aktywność HIF1 α . Konsekwentnie, w sytuacji pełnej dostępności tlenu stymuluje dokomórkowy transport glukozy oraz jej tlenowe glikolityczne przemiany w kierunku syntezy pirogronianu i ATP. Brak jednak dowodów na to, że oreksyna wywiera taki sam efekt w warunkach *in vivo*.

Dostępne dane dostarczają również dowodów na to, że oreksyny wpływają również na metabolizm oraz homeostazę glukozy działając na endokrynne komórki wysp trzustkowych. Obecność receptorów oreksyn w endokrynnej części trzustki została potwierdzona przy użyciu takich metod jak RT-PCR, Western Blot czy techniki fluorescencyjne. Wiadomo, że receptory oreksyn wykazują kolokalizację z insuliną, glukagonem i somatostatyną. Ponadto, komórki endokrynne wysp trzustki syntetyzują i wydzielają oreksynę A. Sekrecja oreksyny A stymulowana jest dokomórkowym napływem jonów wapnia, a także niskim stężeniem glukozy (2,8 mM). Z drugiej strony odnotowano, że wysokie (16,7 mM) stężenie glukozy wpływa hamująco na uwalnianie oreksyny A z endokrynnej czę-

ści trzustki (OUEDRAOGO i współaut. 2003). Dostępne dane, dotyczące roli oreksyn oraz ich receptorów w regulacji sekrecji insuliny, są bardzo dyskusyjne i w większości przypadków dotyczą roli oreksyny A. U szczura podskórna iniekcja oreksyny A, w mniejszym stopniu oreksyny B, skutkuje wyższym stężeniem insuliny we krwi. Wyniki te zostały potwierdzone również w układzie *in situ* z użyciem metody perfuzji trzustek czy *in vitro* podczas inkubacji izolowanych wysp (NOWAK i współaut. 2000, 2005). Z drugiej strony, dostępne są również zupełnie odmienne dane literaturowe prezentujące oreksynę A jako hormon, który nie ma wpływu na sekrecję insuliny (COLOMBO i współaut. 2003), a nawet hamujący jej uwalnianie z komórek β wysp trzustkowych (OUEDRAOGO i współaut. 2003). Dane literaturowe dotyczące wpływu oreksyny na sekrecję glukagonu są bardziej zgodne. Wykazały, że oreksyna A hamuje sekrecję glukagonu, zarówno gdy jest podawana przewlekle w układzie *in vivo*, jak i *in vitro* z izolowanych wysp czy linii komórek alfa (GONCZ i współaut. 2008). Należy jednak wspomnieć, że inne dane prezentują stymulujący wpływ oreksyny A na sekrecję glukagonu (OUEDRAOGO i współaut. 2003). Dlatego poznanie roli oreksyn oraz ich receptorów w regulacji sekrecji hormonów trzustki wymaga dalszych badań i ciągle pozostaje tematem otwartym.

OREKSYNY W REGULACJI FUNKCJI TKANEK OBWODOWYCH

Oreksyny zidentyfikowano jako klasyczne neurohormony, jednak późniejsze badania dowiodły, że oreksyna A obecna jest również we krwi obwodowej, co dowodzi, że oreksyny wywierają efekty biologiczne działając na drodze endokrynnej. Stężenie oreksyny A we krwi utrzymuje się na poziomie od 10^{-12} do 10^{-11} M, co odpowiada stężeniu większości innych hormonów peptydowych. Warto jednak odnotować, że nie jest do końca jasne w jakim stopniu oreksyna A wywiera biologiczne efekty na tkanki peryferyjne. W badaniach nad OXR1 wykazano, że minimalne stężenie liganda zdolne do aktywacji tego receptora wynosi około 10^{-8} M. Z drugiej strony inne dane demonstrowają, że oreksyna A już

w stężeniach pikomolarnych aktywuje zarówno OXR1 i OXR2, zwiększając stężenie wewnątrzkomórkowych jonów wapnia. Główne źródło oreksyny A we krwi nie jest znane, uważa się jednak, że może być to oreksyna syntetyzowana w komórkach endokrynnych przewodu pokarmowego, rozrodczego, trzustki czy też uwolniona z zakończeń nerwowych (TSUNEKI i współaut. 2010).

Ekspresja oreksyn oraz ich receptorów na obwodzie nie jest ograniczona jedynie do wysp trzustkowych, ale zachodzi również w wielu innych tkankach obwodowych, włączając w to narządy endokrynne. Ekspresję preproorsyny oraz receptorów oreksyn zidentyfikowano między innymi

w nadnerczach, układzie rozrodczym, układzie pokarmowym czy tkance tłuszczowej (HEINONEN i współaut. 2008). Jednym z najistotniejszych narządów docelowych dla oreksyn w regulacji homeostazy energetycznej mogą być nadnercza. W korze nadnerczy ekspresji ulegają OXR1 i OXR2. Dostępne dane (MALENDOWICZ i współaut. 1999, 2001) sugerują, że oreksyny regulują uwalnianie hormonów kory nadnerczy, działając na osi podwzgórze-przysadka oraz bezpośrednio na obwodzie. Wykazano, że dokomorowe podanie oreksyny A i B skutkuje wyższymi stężeniami ACTH oraz kortykosteroidów w krwi. Natomiast obwodowe, chroniczne 7-dniowe podawanie oreksyny A podwyższa poziom kortyzolu i aldosteronu, bez wpływu na ACTH. Wyniki te sugerują bezpośrednie oddziaływanie oreksyn na komórki nadnerczy, co więcej, zostały one również potwierdzone w układzie *in vitro*. Z wykorzystaniem izolowanych komórek kory nadnerczy oraz linii hodowlanych komórek endokrynnych nadnercza wykazano, że oreksyna A stymuluje sekrecję glukokortykoidów. Dowiedziono też, że prosekrecyjny efekt wywołany jest aktywacją OXR1, ponieważ jego inhibicja całkowicie znosi stymulujący wpływ oreksyny A. Oreksyna A najprawdopodobniej odgrywa pewną rolę również w rdzeniu nadnerczy, gdzie stymuluje uwalnianie adrenaliny i noradrenaliny (KORCZYŃSKI i współaut. 2006).

Ekspresję OXR1 i OXR2 wykryto też w układzie pokarmowym. U człowieka i szczura ekspresję oreksyn oraz ich receptorów wykryto głównie w zakończeniach nerwowych unerwiających mięśniówkę i śluzówkę jelita oraz w komórkach endokrynnych żołądka i jelita (KIRCHGEßNER i LIU 1999). Większość badań podkreśla rolę oreksyn w regulacji motoryki żołądka oraz jelit, natomiast z punktu widzenia homeostazy energetycznej najbardziej istotny wydaje się być wpływ oreksyn na transport glukozy z jelita cienkiego. Wykazano, że u szczura oreksyny A i B hamują absorpcję glukozy w jelicie cienkim, sugerując kolejny z mechanizmów wykorzystywanych przez oreksyny w krótkoterminowej regulacji homeostazy energetycznej (DUCROC i współaut. 2007).

Oprócz wpływu oreksyn na sekrecję hormonów z wysp trzustki ostatnie wyniki zasugerowały również, że system oreksyn może odgrywać pewną rolę w proliferacji i apoptozie komórek endokrynnych trzustki. Odnotowano, że u szczurów z cukrzycą

indukowaną przez podanie streptozotocyny ekspresja OXR1 w komórkach endokrynnych trzustki znacząco wzrasta i dodatkowo koreluje się z wysokim poziomem aktywnej kaspazy 3 (ADEGHATE i współaut. 2010). Podłoże i mechanizm tej aktywacji pozostają nieznane i sporną kwestią jest czy pierwszy typ receptora oreksyny pośredniczy w indukowaniu apoptozy, czy też jego zwiększona ekspresja ma znaczenie ochronne dla komórki endokrynnej trzustki.

Ostatnie wyniki pokazują, że oreksyny regulują metabolizm energetyczny działając bezpośrednio na tkankę tłuszczową. Ekspresje OXR1 i OXR2 wykryto w adipocytach szczura, człowieka i myszy. W badaniach na ludzkiej tkance tłuszczowej wykazano, że oreksyna A działając na adipocyty stymuluje ekspresję czynnika transkrypcyjnego PPAR γ 2. Czynniki te odgrywa kluczową rolę w adipogenezie, ale również w metabolizmie dojrzałych adipocytów. Ponieważ jego aktywacja powoduje wzrost insulinowrażliwości, stanowi on na poziomie tkanki tłuszczowej najważniejszy cel terapii cukrzycy typu 2. Jest to wykorzystywane w terapii opartej na podawaniu tiazolidinonów – specyficznych aktywatorów PPAR γ .

Badając rolę receptorów oreksyn w adipocytach wykazano, że oreksyna A, i w mniejszym stopniu oreksyna B, hamują lipolizę, a tym samym redukują ilość uwalnianego glicerolu i wolnych kwasów tłuszczowych (DIGBY i współaut. 2006). Badania własne nad rolą receptorów oreksyn w metabolizmie adipocytów szczura i myszy wykazały, że oreksyna A stymuluje dokomórkowy transport glukozy. Co więcej, w badaniach *in vitro* zaobserwowano, że oreksyna A na drodze aktywacji PPAR γ 2 zwiększa ekspresję i sekrecję adiponektyny oraz syntezę kwasów tłuszczowych. Dowiedziono ponadto, że oreksyna A, działając na mysie nieodróżnicowane adipocyty, stymuluje proliferację komórkową i metabolizm tlenowy (ZWIRSKA-KORCZALA i współaut. 2007). Jest to istotne dla zwiększenia populacji wczesnych adipocytów, wykazujących większą insulinowrażliwość. Ponieważ zwiększenie ekspresji PPAR γ 2, redukcja hiperglikemii oraz poziomu wolnych kwasów tłuszczowych czy normalizacja poziomu adiponektyny stanowią najistotniejsze cele w terapii cukrzycy typu 2, bardzo istotne jest potwierdzenie *in vivo* wyników opisanych powyżej.

PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

Trwająca już ponad dekadę historia badań nad oreksynami doprowadziła do zmiany postrzegania tych peptydów. Początkowe badania koncentrowały się głównie na roli oreksyn w regulacji pobierania pokarmu, fizjologii snu oraz wykorzystaniu ich receptorów w terapii narkolepsji i anoreksji. Najnowsze rezultaty wykazały jednak, że spektrum działania oreksyn jest znacznie szersze, obejmując ośrodkowy układ nerwowy ale również tkanki obwodowe. W tkankach peryferyjnych oreksyny są zaangażowane w regulację sekrecji insuliny i glukagonu, ale również w metabolizm tkanki tłuszczowej. Ostatnio wykazano, że oreksyny i ich receptory odgrywają istotną rolę w regulacji insulinowrażliwości, a ich niedobór może stanowić jeden z czynników sprzyjających

rozwojowi cukrzycy typu 2. Z drugiej strony, oreksyny wykazują działanie zapobiegające rozwojowi hiperglikemii, otyłości oraz zwiększają wrażliwość komórek na insulinę i leptynę. Dlatego wydaje się, że receptory oreksyn mogą stanowić istotny cel w normalizacji tych zaburzeń metabolicznych, jednak do określenia kompleksowej roli oreksyn wymagane są kolejne badania, szczególnie nad ich rolą w tkankach obwodowych.

PODZIĘKOWANIA

Niniejsza praca powstała w trakcie realizacji dysertacji doktorskiej Marka Skrzypskiego finansowanej w ramach grantów DFG STR558 (MZS) i MNiSW N311 5083 39 (KWN).

OREXIN AND ENERGY HOMEOSTASIS REGULATION

Summary

The neuropeptide orexin stimulates food intake and energy expenditure by acting on two different receptors isoforms OX1 and OX2. Orexin exists in two isoforms, both of which bind to OX1 and OX2. Studies on genetic engineered animals, which lack or overexpress orexins or its cognate receptors revealed that orexin may play a role in controlling glucose homeostasis and body weight changes. Observational studies in narcoleptic humans, who display orexin deficiency, also indicate that orexin plays a role in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus and obesity. The results implicate that orexin may become an interesting therapeutic tool in alleviating metabolic

diseases and in controlling body weight. Indeed, application of exogenous orexin in narcoleptic humans alleviates the symptoms associated with the disease. Therefore it is important to broaden our understating about the physiological role of orexin as well as to further evaluate its potential in the context of pathophysiology of metabolic diseases. Our review focuses on the recent discoveries of orexin's role in regulating endocrine and metabolic functions *in vivo* and *in vitro*. In addition, it summarizes the accumulated knowledge about its possible involvement in the pathophysiology of two endemic metabolic diseases – type 2 diabetes mellitus and obesity.

LITERATURA

- ADAM J. A., MENHEERE P. P., VAN DIELEN F. M., SOETERS P. B., BUURMAN W. A., GREVE J. W., 2002. *Decreased plasma orexin-A levels in obese individuals*. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 26, 274–276.
- ADEGHATE E., FERNANDEZ-CABEZUDO M., HAMEED R., EL-HASASNA H., EL WASILA M., ABBAS T., AL-RAMADI B., 2010. *Orexin-1 receptor co-localizes with pancreatic hormones in islet cells and modulates the outcome of streptozotocin-induced diabetes mellitus*. PLoS One 5, e8587.
- AMMOUN S., JOHANSSON L., EKHOLM M. E., HOLMQVIST T., DANIS A. S., KORHONEN L., SERGEEVA O. A., HAAS H. L., AKERMAN K. E., KUKKONEN J. P., 2006. *OX1 orexin receptors activate extracellular signal-regulated kinase in Chinese hamster ovary cells via multiple mechanisms: the role of Ca²⁺ influx in OX1 receptor signaling*. Mol. Endocrinol. 20, 80–99.
- BARDOS J. I., ASHCROFT M., 2005. *Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network*. Biochim. Biophys. Acta. 1755, 107–120.
- BEREZINSKA M., ZAWILSKA J. B., 2007. *Hipokretyny – rola w regulacji rytmu sen-czuwanie i patogenezie narkolepsji*. Postępy Hig. Med. Dośw. 61, 1–12.
- BEUCKMANN C. T., YANAGISAWA M., 2002. *Orexins: from neuropeptides to energy homeostasis and sleep/wake regulation*. J. Mol. Med. 80, 329–342.
- COLOMBO M., GREGERSEN S., XIAO J., HERMANSEN K., 2003. *Effects of ghrelin and other neuropeptides (CART, MCH, orexin A and B, and GLP-1) on the release of insulin from isolated rat islets*. Pancreas 27, 161–166.
- DE LECEA L., KILDUFF T. S., PEYRON C., GAO X., FOYE P. E., DANIELSON P. E., FUKUHARA C., BATTENBERG E. L., GAUTVIK V. T., BARTLETT F. S. 2ND, FRANKEL W. N., VAN DEN POL A. N., BLOOM F. E., GAUTVIK K. M., SUTCLIFFE J. G., 1998. *The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 322–327.
- DIGBY J. E., CHEN J., TANG J. Y., LEHNERT H., MATTHEWS R. N., RANDEVA H. S., 2006. *Orexin receptor expression in human adipose tissue: effects*

- of orexin-A and orexin-B. *J. Endocrinol.* 191, 129–136.
- DUCROC R., VOISIN T., EL FIRAR A., LABURTHE M., 2007. *Orexins control intestinal glucose transport by distinct neuronal, endocrine, and direct epithelial pathways.* *Diabetes* 56, 2494–2500.
- FUNATO H., TSAI A. L., WILLIE J. T., KISANUKI Y., WILLIAMS S. C., SAKURAI T., YANAGISAWA M., 2009. *Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity.* *Cell Metab.* 9, 64–76.
- GEROZISSIS K., 2008. *Brain insulin, energy and glucose homeostasis; genes, environment and metabolic pathologies.* *Eur. J. Pharmacol.* 585, 38–49.
- GONCZ E., STROWSKI M. Z., GROTZINGER C., NOWAK K. W., KACZMAREK P., SASSEK M., MERGLER S., EL-ZAYAT B. F., THEODOROPOULOU M., STALLA G. K., WIEDENMANN B., PLOCKINGER U., 2008. *Orexin-A inhibits glucagon secretion and gene expression through a Foxo1-dependent pathway.* *Endocrinology* 149, 1618–1626.
- HARA J., YANAGISAWA M., SAKURAI T., 2005. *Difference in obesity phenotype between orexin-knockout mice and orexin neuron-deficient mice with same genetic background and environmental conditions.* *Neurosci Lett.* 380, 239–242.
- HEINONEN M. V., PURHONEN A. K., MAKELA K. A., HERZIG K. H., 2008. *Functions of orexins in peripheral tissues.* *Acta Physiol. (Oxf.)* 192, 471–485.
- KIRCHGESSNER A. L., LIU M., 1999. *Orexin synthesis and response in the gut.* *Neuron* 24, 941–951.
- KORCZYNSKI W., CEREGRZYŃ M., MATYJEK R., KATO I., KUWAHARA A., WOLINSKI J., ZABIELSKI R., 2006. *Central and local (enteric) action of orexins.* *J. Physiol. Pharmacol.* 57 (Suppl. 6), 17–42.
- LONGSTRETH W. T., JR., KOEPEL T. D., TON T. G., HENDRICKSON A. F., VAN BELLE G., 2007. *The epidemiology of narcolepsy.* *Sleep* 30, 13–26.
- MALENDOWICZ L. K., TORTORELLA C., NUSSDORFER G. G., 1999. *Orexins stimulate corticosterone secretion of rat adrenocortical cells, through the activation of the adenylate cyclase-dependent signaling cascade.* *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 70, 185–188.
- MALENDOWICZ L. K., JEDRZEJCZAK N., BELLONI A. S., TREJTER M., HOCHÓŁ A., NUSSDORFER G. G., 2001. *Effects of orexins A and B on the secretory and proliferative activity of immature and regenerating rat adrenal glands.* *Histol. Histopathol.* 16, 713–717.
- MAZZA M., DELLA MARCA G., PACIELLO N., MENNUNI G., BRIA P., MAZZA S., 2005. *Orexin, sleep and appetite regulation: a review.* *Clin. Ter.* 156, 93–96.
- NISHINO S., KANBAYASHI T., 2005. *Symptomatic narcolepsy, cataplexy and hypersomnia, and their implications in the hypothalamic hypocretin/orexin system.* *Sleep Med. Rev.* 9, 269–310.
- NOWAK K. W., MAĆKOWIAK P., ŚWITOŃSKA M. M., FABIŚ, M., MALENDOWICZ, L. K., 2000. *Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: In vivo and in vitro studies.* *Life Sci.* 66, 449–454.
- NOWAK K. W., STROWSKI M. Z., SWITONSKA M. M., KACZMAREK P., SINGH V., FABIŚ M., MAĆKOWIAK P., NOWAK M., MALENDOWICZ L. K., 2005. *Evidence that orexins A and B stimulate insulin secretion from rat pancreatic islets via both receptor subtypes.* *Int. J. Mol. Med.* 15, 969–972.
- NUNEZ A., RODRIGO-ANGULO M. L., ANDRES I. D., GARZON M., 2009. *Hypocretin/Orexin neuropeptides: participation in the control of sleep-wakefulness cycle and energy homeostasis.* *Curr. Neuropharmacol.* 7, 50–59.
- OUEDRAOGO R., NASLUND E., KIRCHGESSNER A. L., 2003. *Glucose regulates the release of orexin-a from the endocrine pancreas.* *Diabetes* 52, 111–117.
- RAMANJANEYA M., CONNER A. C., CHEN J., KUMAR P., BROWN J. E., JOHREN O., LEHNERT H., STANFIELD P. R., RANDEVA H. S., 2009. *Orexin-stimulated MAP kinase cascades are activated through multiple G-protein signalling pathways in human H295R adrenocortical cells: diverse roles for orexins A and B.* *J. Endocrinol.* 202, 249–261.
- RODGERS R. J., ISHII Y., HALFORD J. C., BLUNDELL J. E., 2002. *Orexins and appetite regulation.* *Neuropeptides* 36, 303–325.
- SAKURAI T., AMEMIYA A., ISHII M., MATSUZAKI I., CHEMELLI R. M., TANAKA H., WILLIAMS S. C., RICHARDSON J. A., KOZLOWSKI G. P., WILSON S., ARCH J. R., BUCKINGHAM R. E., HAYNES A. C., CARR S. A., ANNAN R. S., MCNULTY D. E., LIU W. S., TERRETT J. A., ELSHOUBAGY N. A., BERGSMAN D. J., YANAGISAWA M., 1998. *Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior.* *Cell* 92, 573–585.
- SHIUCHI T., HAQUE M. S., OKAMOTO S., INOUE T., KAGEYAMA H., LEE S., TODA C., SUZUKI A., BACHMAN E. S., KIM Y. B., SAKURAI T., YANAGISAWA M., SHIODA S., IMOTO K., MINOKOSHI Y., 2009. *Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system.* *Cell Metab.* 10, 466–480.
- SIKDER D., KODADEK T., 2007. *The neurohormone orexin stimulates hypoxia-inducible factor-1 activity.* *Genes. Dev.* 21, 2995–3005.
- SMART D., JERMAN J., 2002. *The physiology and pharmacology of the orexins.* *Pharmacol. Ther.* 94, 51–61.
- SWEET D. C., LEVINE A. S., BILLINGTON C. J., KOTZ C. M., 1999. *Feeding response to central orexins.* *Brain Res.* 821, 535–538.
- TAKANO S., KANAI S., HOSOYA H., OHTA M., UEMATSU H., MIYASAKA K., 2004. *Orexin-A does not stimulate food intake in old rats.* *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G1182–G1187.
- TOSHINAI K., DATE Y., MURAKAMI N., SHIMADA M., MONDAL M. S., SHIMBARA T., GUAN J. L., WANG Q. P., FUNAHASHI H., SAKURAI T., SHIODA S., MATSUKURA S., KANGAWA K., NAKAZATO M., 2003. *Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway.* *Endocrinology* 144, 1506–1512.
- TSUNEKI H., SUGIHARA Y., HONDA R., WADA T., SASAOKA T., KIMURA I., 2002. *Reduction of blood glucose level by orexins in fasting normal and streptozotocin-diabetic mice.* *Eur. J. Pharmacol.* 448, 245–252.
- TSUNEKI H., MURATA S., ANZAWA Y., SOEDA Y., TOKAI E., WADA T., KIMURA I., YANAGISAWA M., SAKURAI T., SASAOKA T., 2008. *Age-related insulin resistance in hypothalamus and peripheral tissues of orexin knockout mice.* *Diabetologia* 51, 657–667.
- TSUNEKI H., WADA T., SASAOKA T., 2010. *Role of orexin in the regulation of glucose homeostasis.* *Acta Physiol. (Oxf.)* 198, 335–348.
- WANG J., OSAKA T., INOUE S., 2001. *Energy expenditure by intracerebroventricular administration of orexin to anesthetized rats.* *Neurosci. Lett.* 315, 49–52.
- ZWIRSKA-KORCZALA K., ADAMCZYK-SOWA M., SOWA P., PILC K., SUCHANEK R., PIERZCHALA K., NAMYSŁOWSKI G., MISIOLEK M., SODOWSKI K., KATO I., KUWAHARA A., ZABIELSKI R., 2007. *Role of leptin, ghrelin, angiotensin II and orexins in 3T3 L1 preadipocyte cells proliferation and oxidative metabolism.* *J. Physiol. Pharmacol.* 58 (Suppl. 1), 53–64.