



JAGIELLONIAN UNIVERSITY
IN KRAKOW

Biochemia

stresu oksydacyjnego

Wykład 7

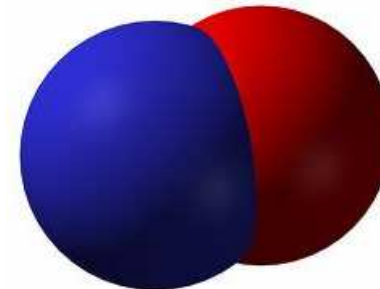
Interakcje między głównymi szlakami cytoprotekcyjnymi;
Glutation



Interakcje między NOS i HO

NO i CO mają wiele cech wspólnych:

- Mają podobną masę cząsteczkową (30.1 i 28.1 Da)
- Mają podobną rozpuszczalność w wodzie (4.7 ml/100 ml i 2.6 ml/100 ml)
- Mają podobny poziom produkcji w organizmie w warunkach kontrolnych (850 μmol /dzień i 500 μmol /dzień)
- Aktywują sGC i zwiększają produkcję cGMP
- Działają jako neurotransmitery w mózgu
- Działają wazorelaksacyjnie
- Hamują agregację płytek
- Zwiększają produkcję i nasilają aktywność niektórych czynników proangiogennych
- Produkcja CO (z hemu przez HO) i NO (z argininy przez NOS) wymaga tlenu i NADPH





Interakcje między NOS i HO

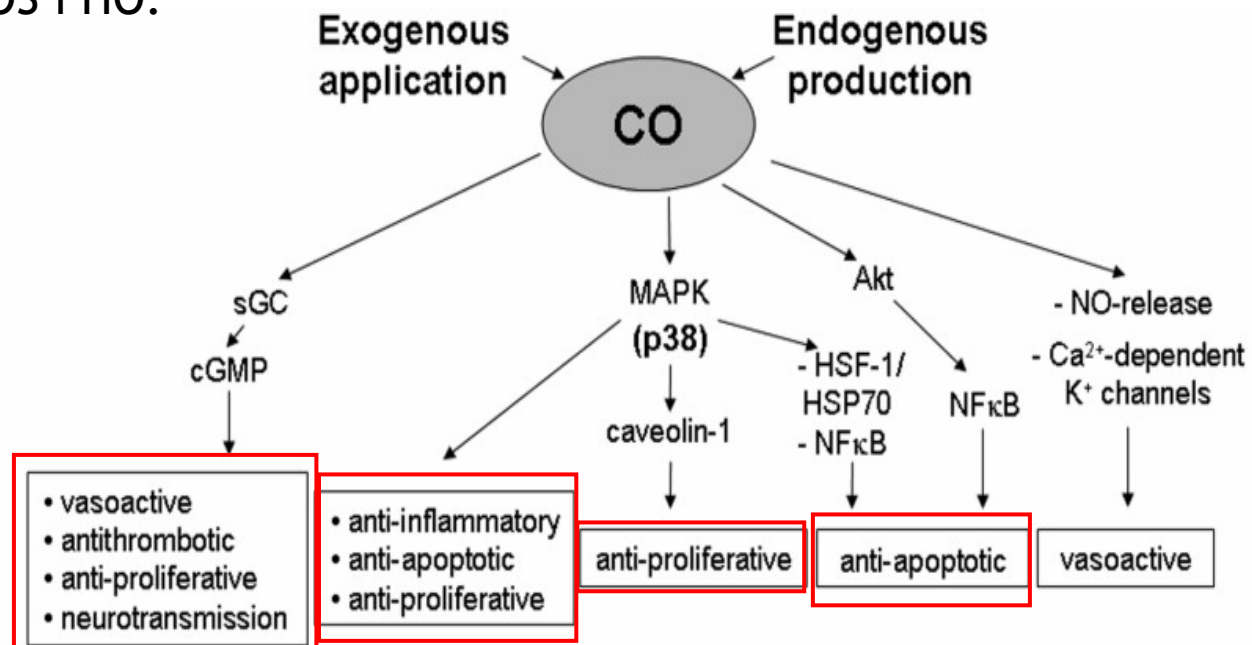
- NO i CO mają też cechy odmienne:

* NO jest wolnym rodnikiem, posiadającym niesparowany elektron, tworzącym po jego utraceniu jon nitrozonowy (NO^+); tworzy kompleksy z wieloma metalami

* CO jest stabilnym gazem, nie jest wolnym rodnikiem, dlatego nie podlega wielu reakcjom oksydoredukcyjnym typowym dla NO

* CO wiąże się tylko do żelaza Fe^{2+} w hemie, a NO zarówno do żelaza Fe^{2+} jak i Fe^{3+} w białkach hemowych.

- Wiele efektów fizjologicznych jest wypadkową działania NO i CO, czyli wypadkową aktywacji NOS i HO.





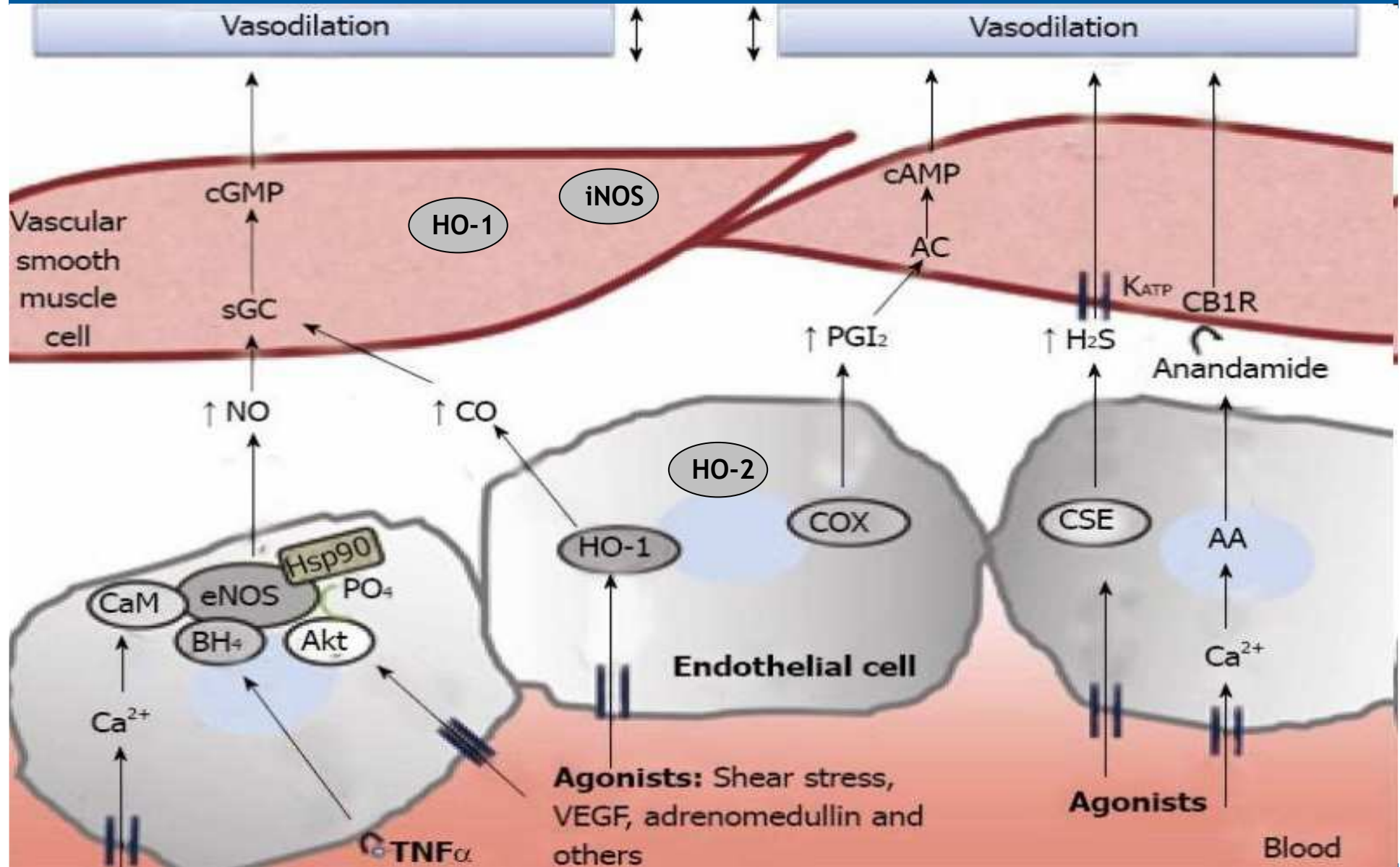
Interakcje między NOS i HO

- Lokalizacje komórkowa NOS i HO jest podobna.
- Konstrytutywne formy HO (HO-2) i NOS (eNOS i nNOS):
 - * są regulowane przez glukokortykoidy (aktywność HO-2 jest nasilana, aktywność nNOS jest zmniejszana)
- Indukowalne formy HO (HO-1) i NOS (iNOS):
 - * są regulowane na poziomie transkrypcji przez podobne czynniki transkrypcyjne (np. NFκB)
 - * nie wszystkie aktywatory HO-1 aktywują również iNOS
- Inaczej niż synteza CO, synteza NO wymaga dodatkowych kofaktorów (BH₄, FAD, FMN, kalmoduliny, Ca²⁺).
- NOS może produkować również O₂^{·-}. HO nie produkują O₂^{·-}. Co więcej, indukcja HO-1 jest związana z aktywacją MnSOD i dysmutacja O₂^{·-}





Interakcje między NOS i HO

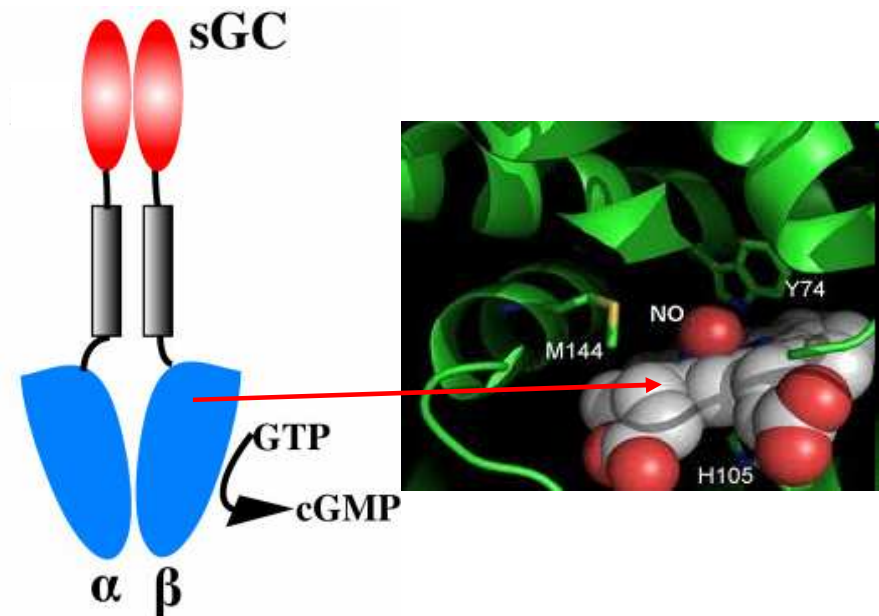




Wpływ NO i CO na produkcję cGMP

- CO i NO wiążą się z jonem żelaza reszty hemowej jednostki β sGC.
- W jednostce β sGC hem jest przyłączony do białka poprzez boczny łańcuch imidazolowy histydyny-105 (ImH).
 - * Aktywacja sGC przez NO rozpoczyna się od przyłączenia NO do hemu i rozerwania wiązania Fe-ImH), co prowadzi do 100-400 krotnego wzrostu aktywności enzymatycznej sGC.
 - * CO wiąże się do hemu w sGC z niższym powinowactwem i nie rozrywa wiązania Fe-ImH, co w niewielkim stopniu (4-6 razy) zwiększa aktywność enzymatyczną sGC.

- Znaczenie CO jako aktywatora sGC w komórkach jest zagadkowe:
 - * badania wpływu CO na funkcje zależne od cGMP świadczą o istotności takiego mechanizmu
 - * koekspresja HO (zwłaszcza HO-2) i sGC sugeruje współdziałanie tych enzymów
 - * słaby poziom aktywacji sGC przez CO podważa znaczenie biologiczne tego szlaku.



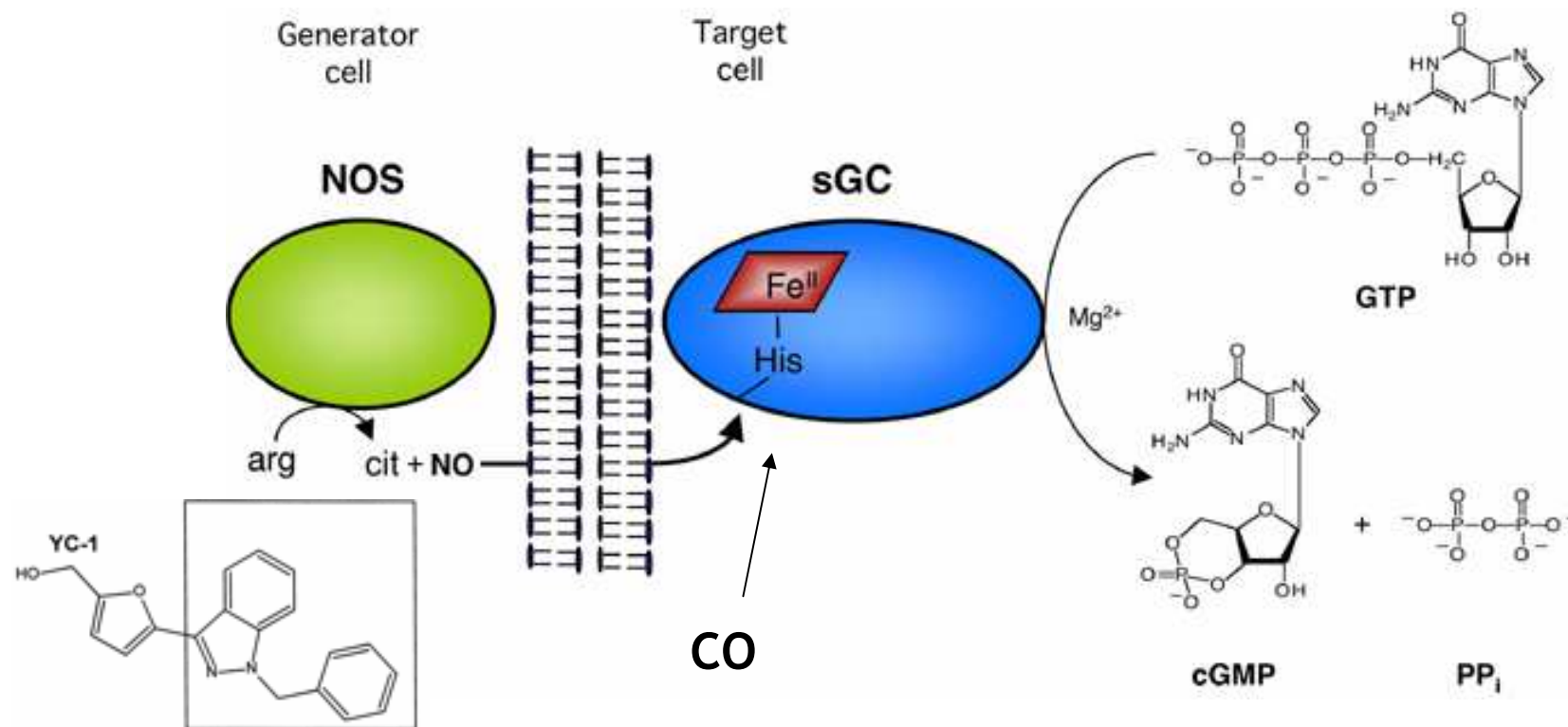


Wpływ NO i CO na produkcję cGMP

- Jednym z możliwych wyjaśnień jest istnienie wewnątrzkomórkowej substancji zwiększającej efektywność działania CO na sGC.

* Przykładem może być YC-1 (benzyłowa pochodna indazolu, stabilizująca aktywną konformację sGC), w której obecności poziom aktywacji sGC przez CO jest podobny jak poziom aktywacji po NO.

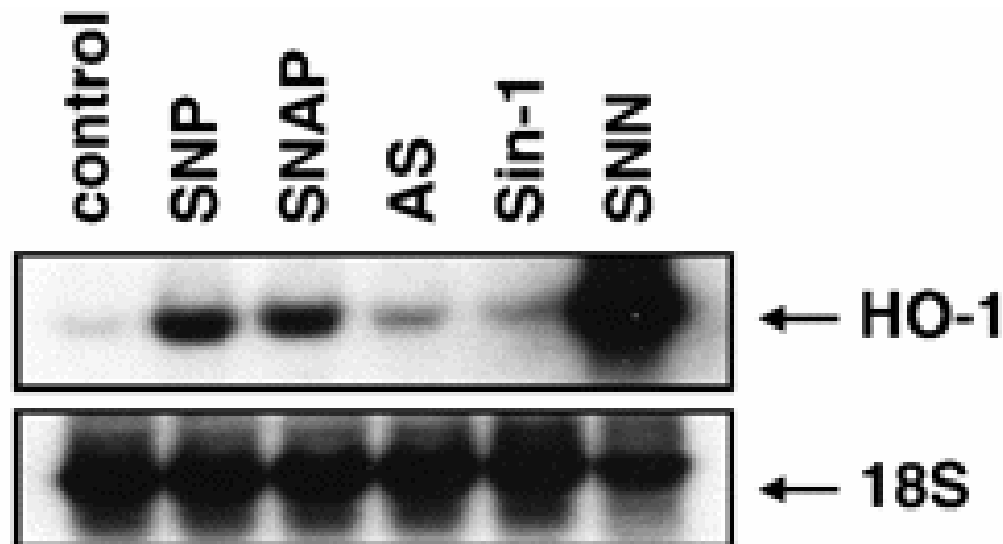
* YC-1 zwiększa także skuteczność NO w aktywacji sGC (o ok. 40%)





Wpływ NOS na aktywność HO

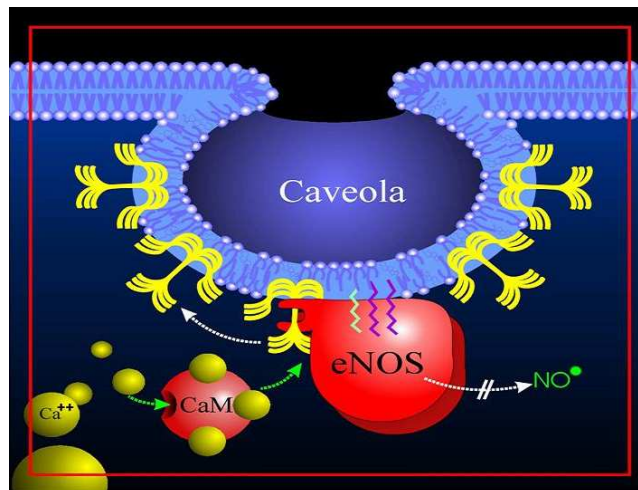
- NO zwiększa ekspresję HO-1 nasilając transkrypcję oraz zwiększając stabilność mRNA HO-1, działając przez różne mechanizmy, wciąż nie do końca zidentyfikowane:
 - * zarówno niezależnie jak i zależnie od cGMP
 - * zależnie od indukcji stresu oksydacyjnego, w tym produkcji nadtlenoazotynu
 - * w sposób zależny od aktywacji kinaz ERK i p38
- Przyłączenie NO do HO-2 zmniejsza aktywność enzymatyczną HO-2.





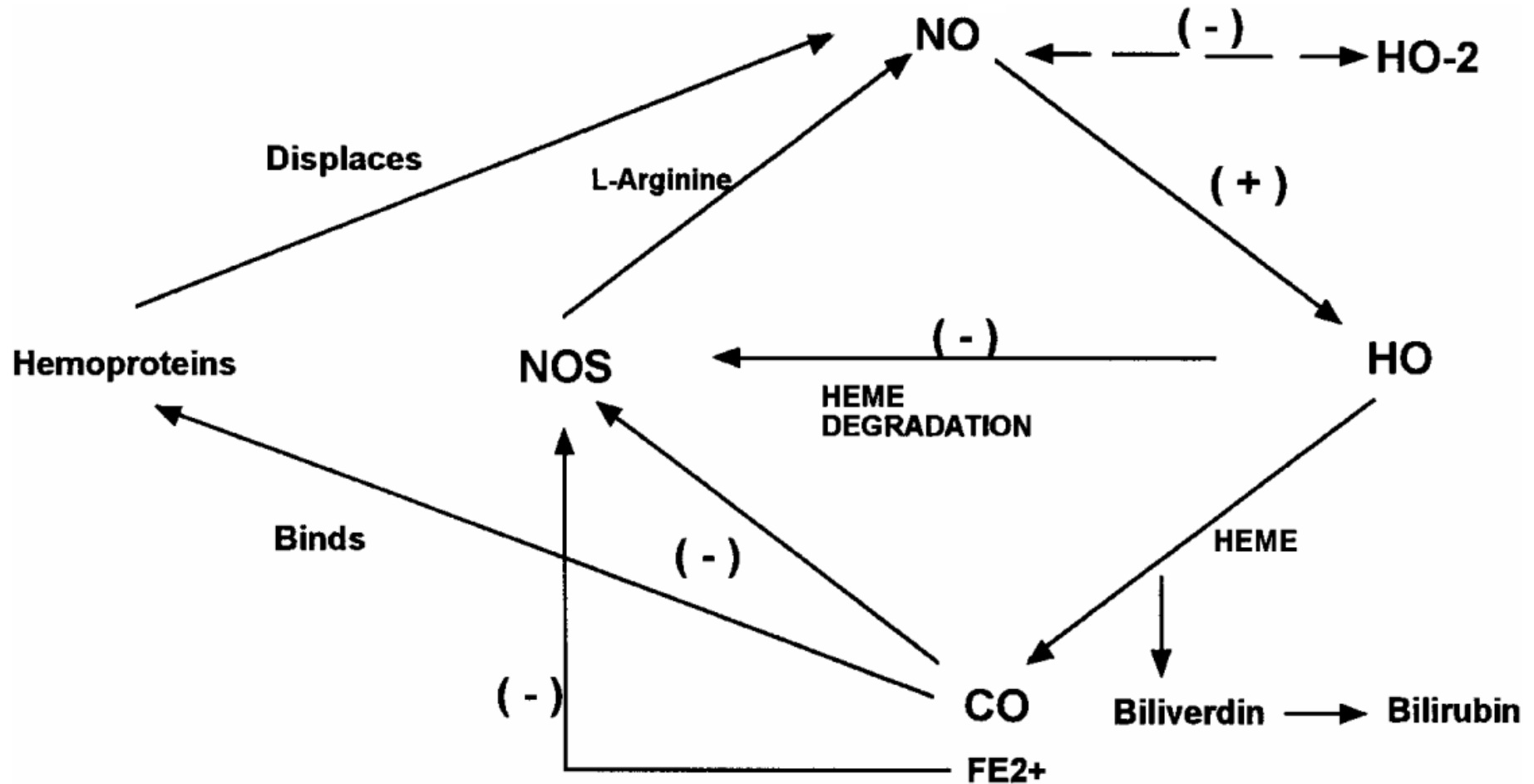
Wpływ HO na aktywność NOS

- Aktywacja HO może obniżać produkcję NO przez NOS. Możliwe mechanizmy:
 - * NOS zawiera dwie reszty hemowe w centrum aktywnym. Silna aktywacja HO może zmniejszać dostępność hemu do syntezy białka NOS lub może prowadzić do degradacji hemu w obrębie NOS.
 - * żelazo uwalniane z hemu w wyniku aktywności HO może hamować transkrypcję NOS
 - * duża aktywność HO i BvR może zmniejszać dostępność NADPH
 - * związanie CO przez NOS zmniejsza aktywność enzymatyczną i hamuje produkcję NO (może mieć znaczenie przy regulacji reakcji zapalnej)
- Niskie stężenia CO nie hamują produkcji NO, a nawet mogą ją nasilać.



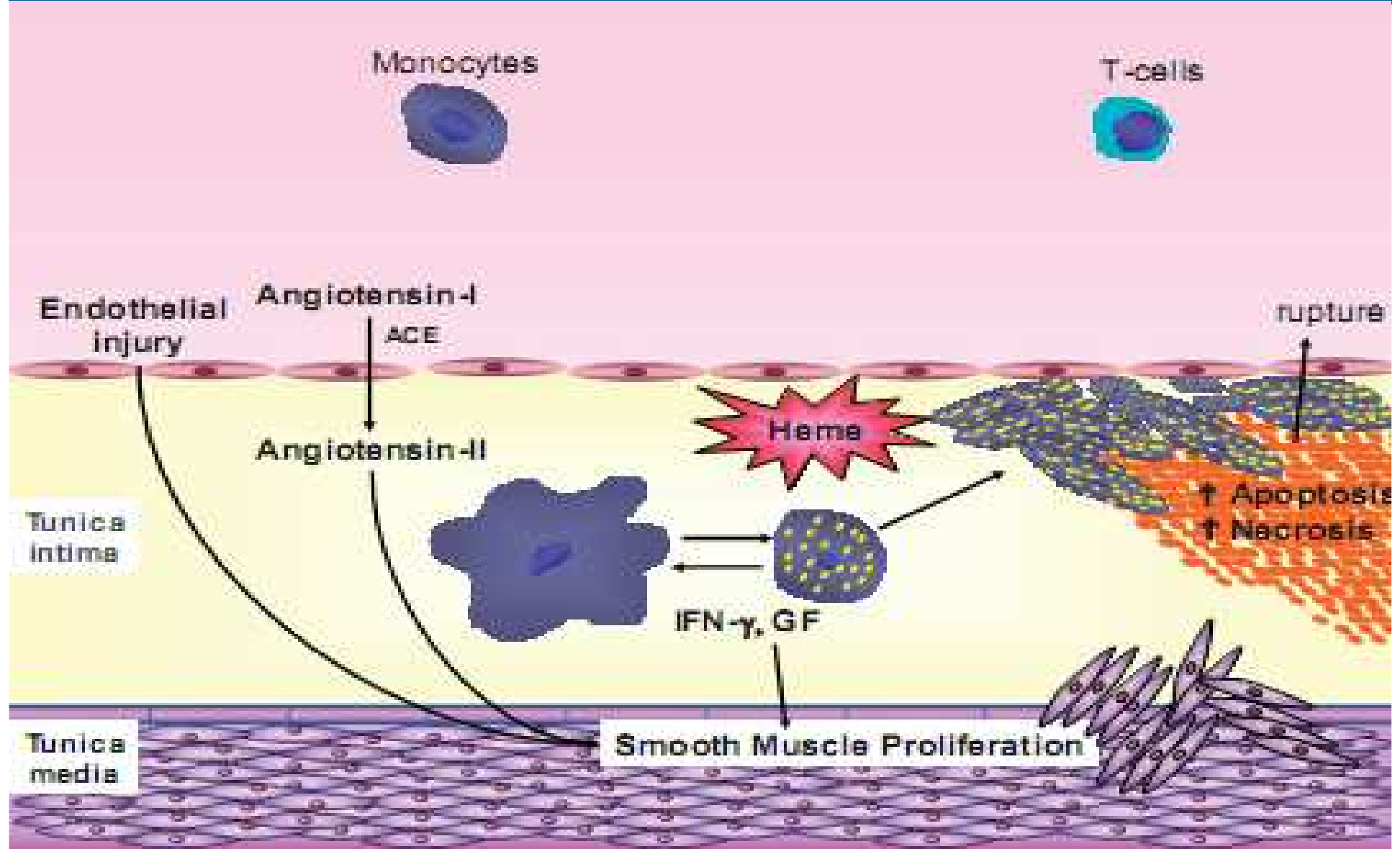


Interakcje między NOS i HO





Interakcje między NOS i HO





NO, CO i migracja komórek

- NO reguluje dystrybucję białka VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), białka ułatwiającego wydłużanie włókiem aktyny w migrującej komórce.

* VASP zawiera 3 reszty aminokwasowe, które mogą podlegać fosforylacji (Ser-157, Ser-239 i Thr-278)

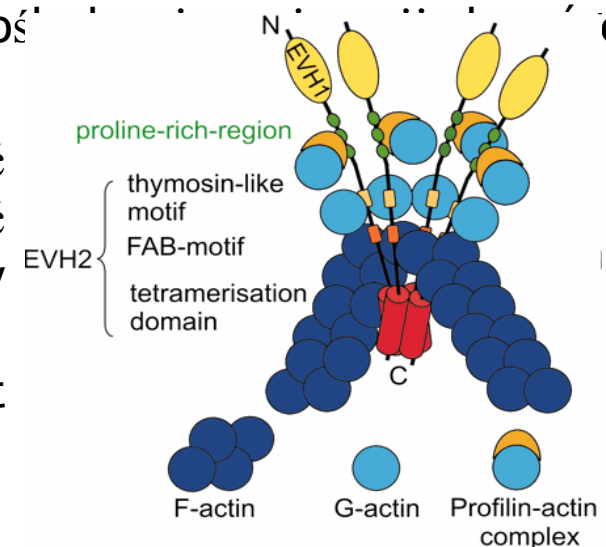
* Ser-157 jest fosforylowana przez PKA (zależna od cAMP)

* **Ser-239** jest fosforylowana przez **PKG** (zależna od cGMP)

* Fosforylacja VASP wpływa na aktywność białka, architekturę cytoszkieletu aktynowego i ruchliwość komórek

- Niewystarczająca fosforylacja VASP (niewystarczająca aktywność PKG wynikająca z małej dostępności NO) jest jedną z przyczyn upośledzenia migracji komórek progenitorowych śródbłonna w cukrzycy.

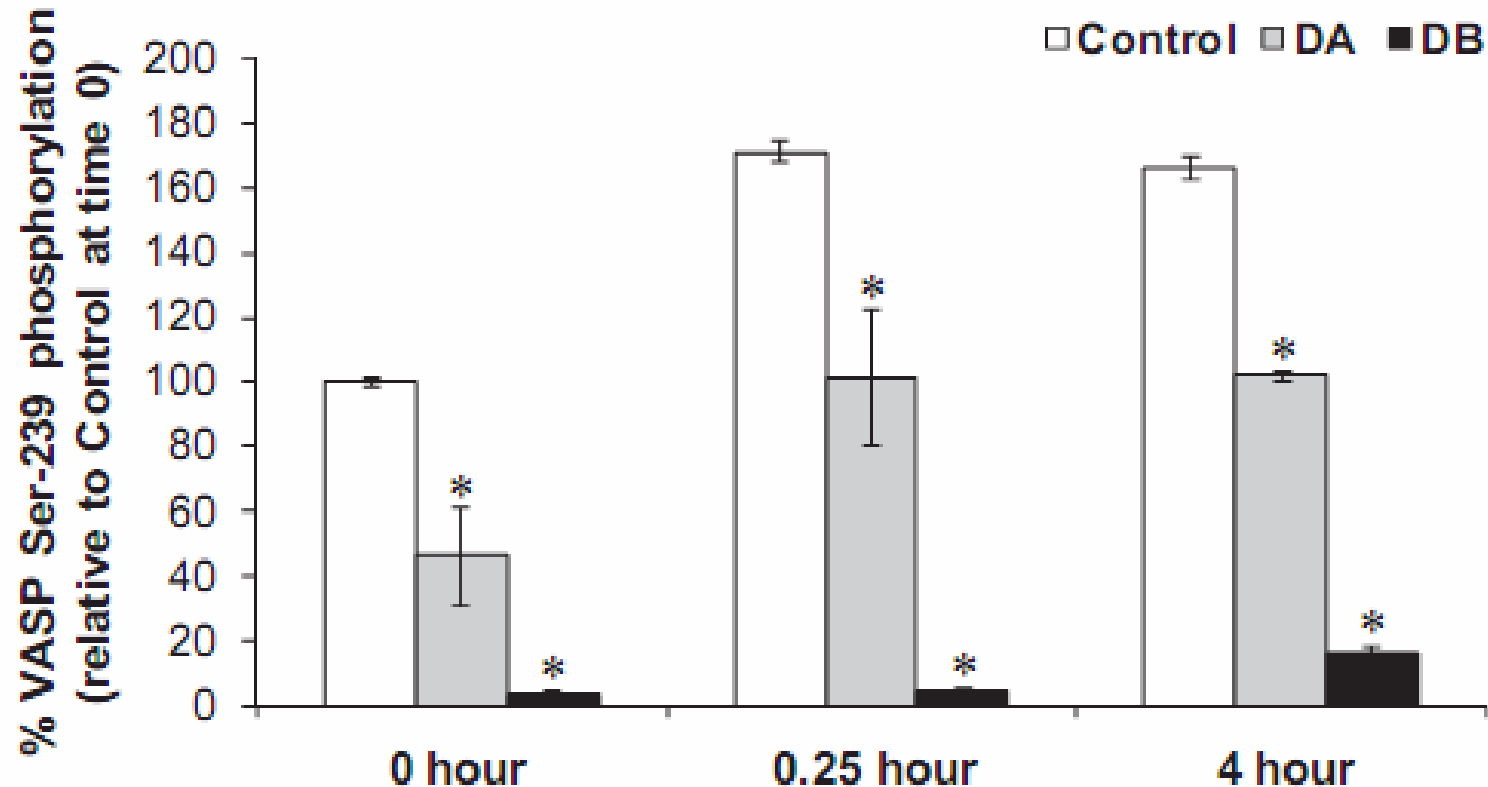
- U pacjentów z cukrzycą niedobór NO może być częściowo rekompensowany przez produkcję CO (choć aktywność HO może być także osłabiona), który aktywuje cGMP i prowadzi do fosforylacji VASP-1. Jednak odpowiedź zarówno na NO jak i na CO jest osłabiona.





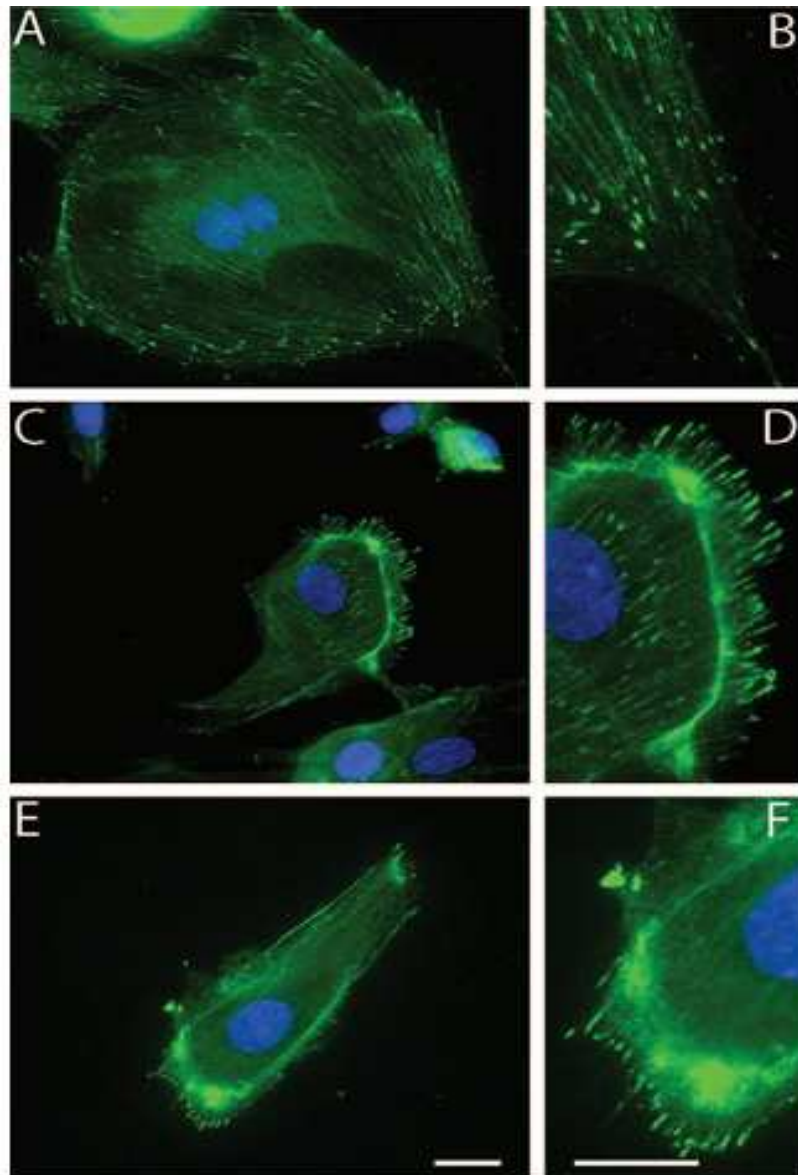
NO, CO i migracja komórek

Fosforylacja VASP w EPC pobranych od osób zdrowych (control) i osób z cukrzycą (DA i DB) i inkubowanych w obecności NO





NO, CO i migracja komórek



Lokalizacja VASP w komórkach śródbłónka w warunkach kontrolnych

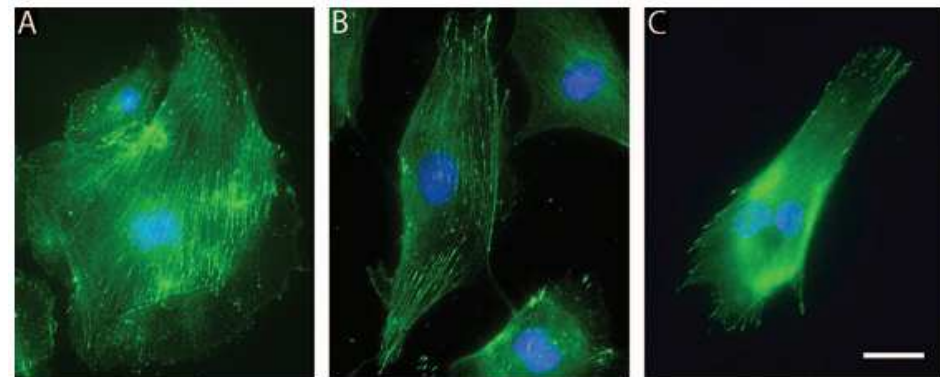
kontrola

Lokalizacja VASP w komórkach śródbłónka w hiperglikemii

kontrola

CO

NO



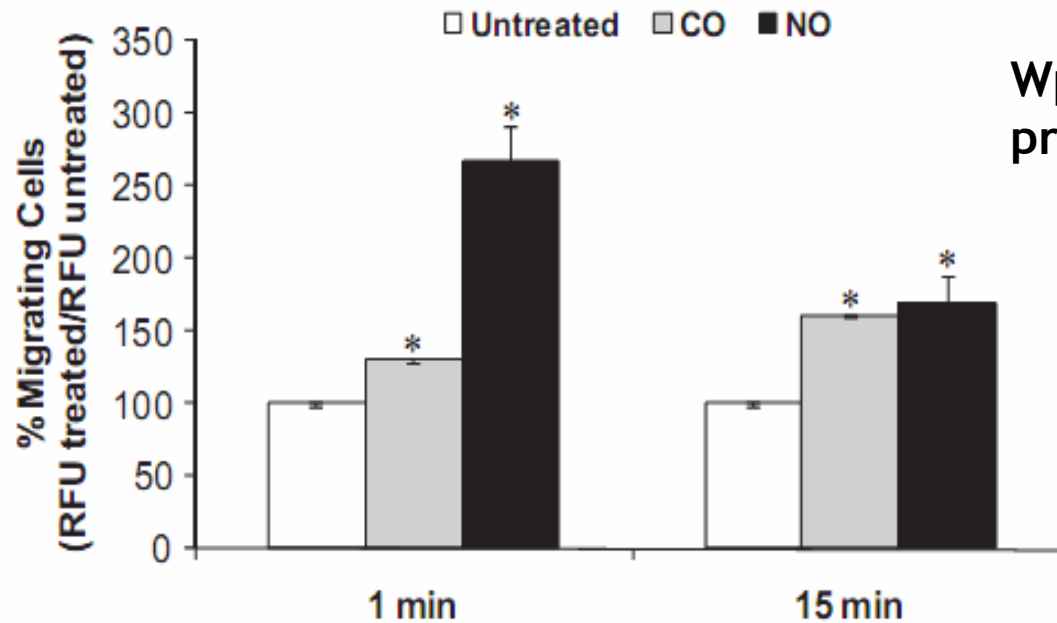
CO

NO



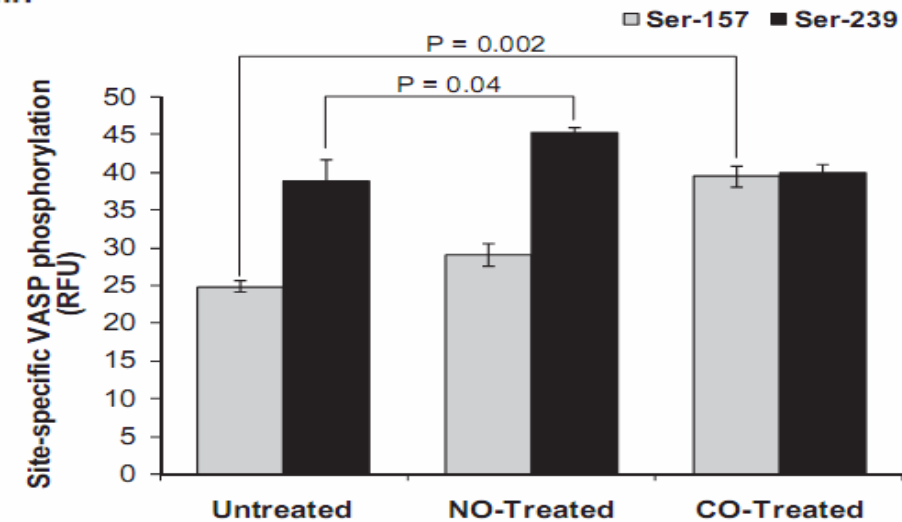


NO, CO i migracja komórek



Wpływ CO i NO na migrację komórek progenitorowych śródbłonna

Wpływ CO i NO na fosforylację VASP





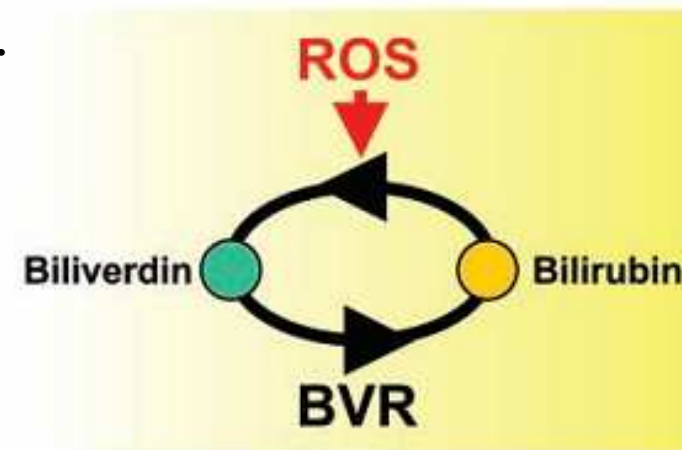
Bilirubina - znaczenie fizjologiczne

Bilirubina:

- ma silne właściwości antyoksydacyjne w niskich stężeniach, ale w wysokich stężeniach może być pro-oksydacyjna,
- hamuje ekspresję $\text{TNF}\alpha$, iNOS (oraz produkcję NO); działa przy tym poprzez pośrednią aktywację receptorów CAR (receptor jądrowy, constitutive androstane receptor) lub bezpośrednią aktywację receptorów AhR (aryl hydrocarbon receptor),
- hamuje ekspresję adhezyn na komórkach śródbłonna (np. VCAM-1) oraz adhezję i infiltrację leukocytów do ściany naczyń krwionośnych
- hamuje aktywność metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9.

Cykl redoks biliwerdyny i bilirubiny:

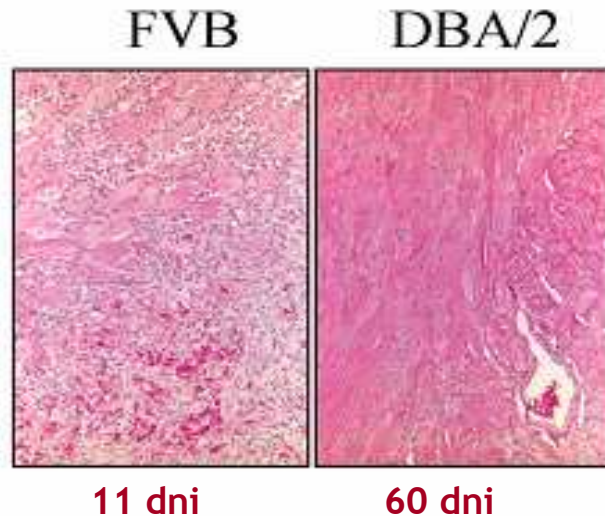
- Biliwerdyna jest redukowana do bilirubiny przez BvR i w ten sposób bilirubina jest regenerowana kiedy ROS utleniają ją do biliwerdyny. Dzięki temu niskie stężenia bilirubiny mogą neutralizować duże ilości ROS.





Immunomodulujące działanie biliwerdyny

- Podanie biliwerdyny hamuje odrzucanie przeszczepów serca u myszy oraz indukuje tolerancję.
- Bilirubina zmniejsza nacieki limfocytarne w przeszczepionym sercu i hamuje proliferację limfocytów T.
- Działa poprzez hamowanie czynników transkrypcyjnych:
 - * NF κ B
 - * NFAT



Indukcja immunotolerancji:

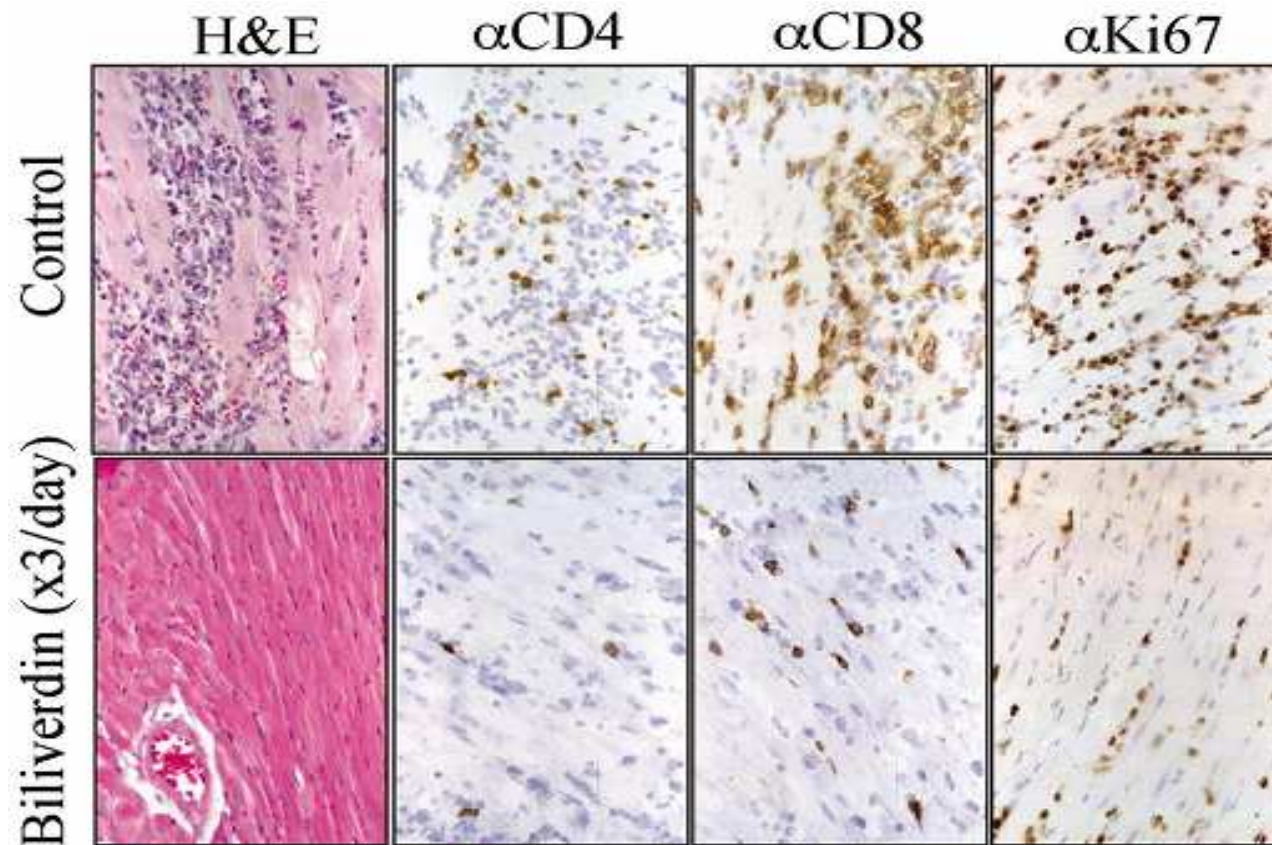
- serce od myszy DBA/2 były przeszczepiane myszom B6AF1. Biorcy otrzymywali biliwerdynę dootrzewnowo codziennie przez 2 tygodnie (50 μ mol/kg). Przeszczepy przeżywały ponad 100 dni.
- Następnie wykonywano drugi przeszczep od myszy DBA/2 lub od myszy FVB.





Immunomodulujące działanie biliwerdyny

Podanie biliwerdyny hamuje odpowiedź przeciwko allogenicznemu przeszczepowi serca



- biliwerdyna zmniejsza nacieki limfocytów T pomocniczych (CD4+) i cytotoksycznych (CD8+);

- biliwerdyna zmniejsza też liczbę komórek proliferujących (Ki67+)

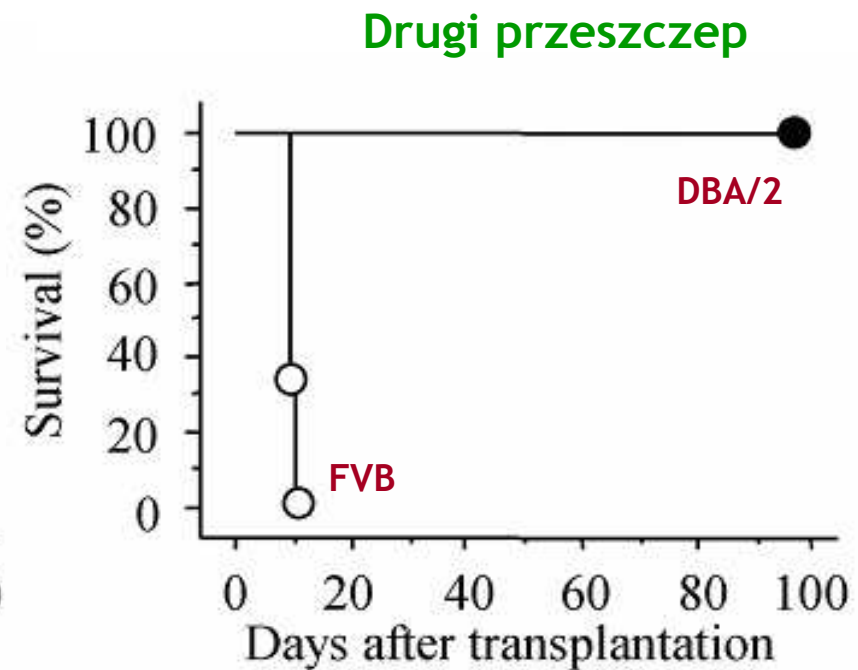
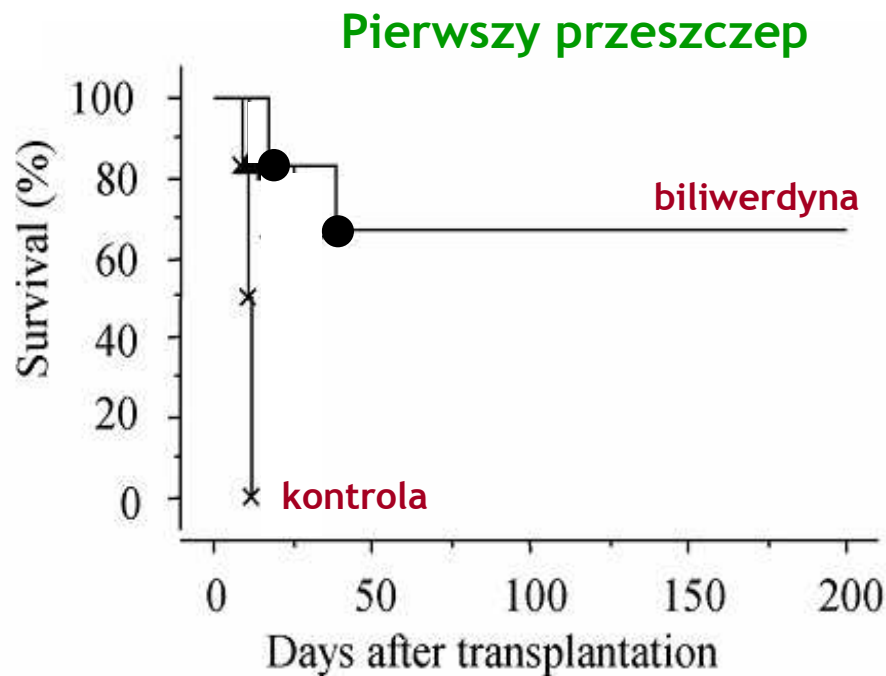




Immunomodulujące działanie biliwerdyny

Indukcja immunotolerancji:

- serca od myszy DBA/2 były przeszczepiane myszom B6AF1. Biorcy otrzymywali biliwerdynę dootrzewnowo codziennie przez 2 tygodnie (50 $\mu\text{mol/kg}$). Przeszczepy przeżywały ponad 100 dni.
- Następnie wykonywano drugi przeszczep od myszy DBA/2 lub od myszy FVB.

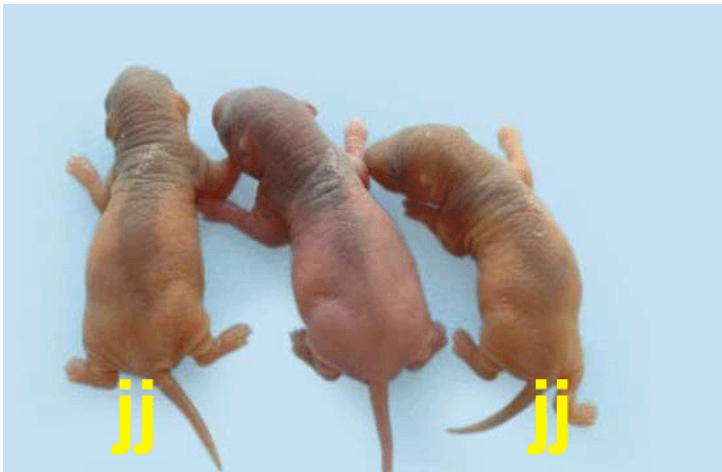




Zwierzęce modele hiperbilirubinemii

Szczury Gunn

Gen kodujący białko UGT1A1 ma niewłaściwy kodon Stop, co prowadzi do powstawania krótszego, mało aktywnego białka.



Homozygoty (jj) mają żółtawe zabarwienie skóry.

Myszy UGT1A1 KO

Brak aktywności białka UGT1A1 prowadzi do bardzo silnej hiperbilirubinemii. Myszy żyją najwyżej 2 tygodnie.



← Ugt1^{-/-} →

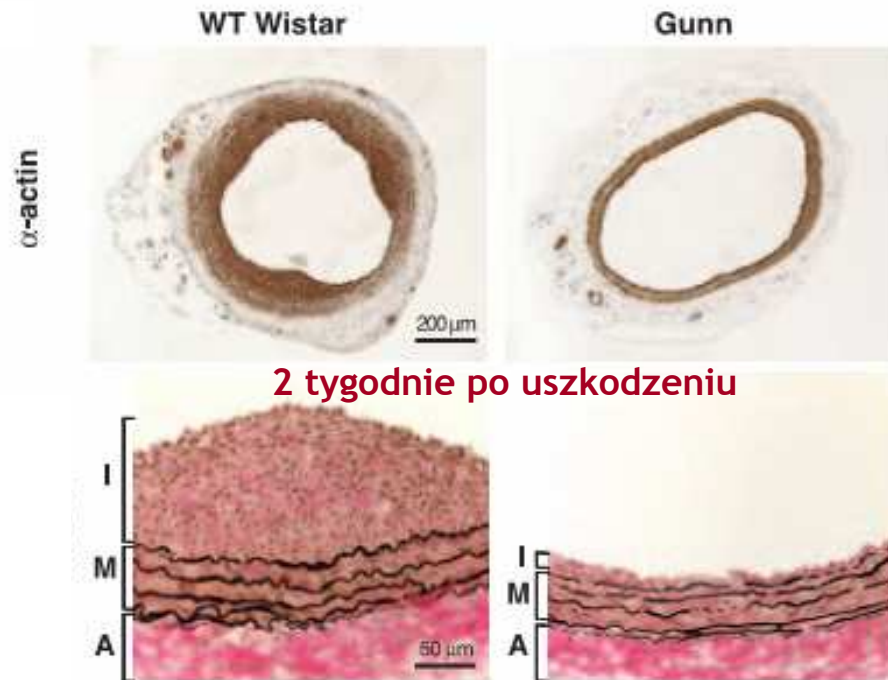
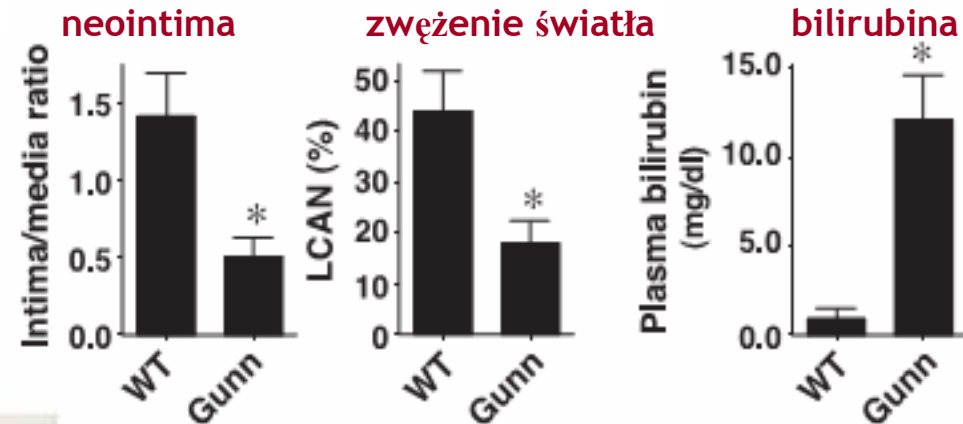




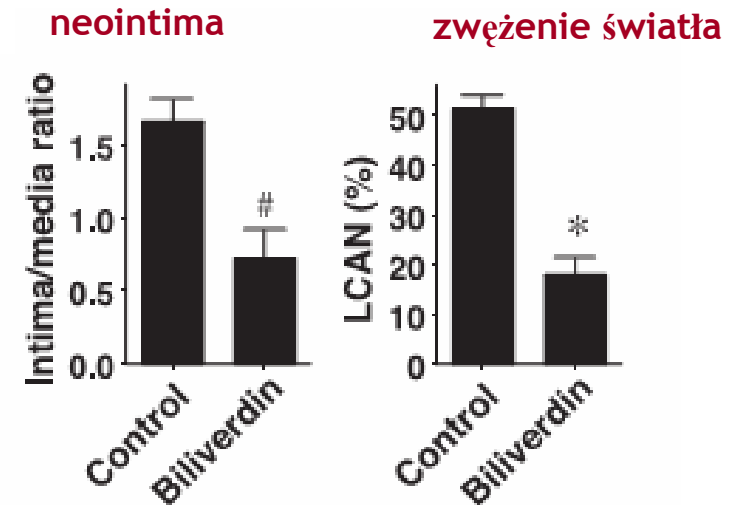
Przeciwmiążdżycowe działanie Bv/Br

- Indukcja miażdżycy w wyniku uszkodzenia śródbłonna tętnicy u szczurów z normalnym i wysokim poziomem bilirubiny
- wpływ podawania biliwerdyny na rozwój miażdżycy u szczurów WT

Szczury Gunn



Podawanie biliwerdyny





Bilirubina - znaczenie fizjologiczne

- Hiperbilirubinemia:
 - * żółtaczka noworodków
 - * choroba hemolityczna noworodka (wynik niezgodności grup Rh- u matki Rh- i dziecka Rh+, prowadzącej do hemolizy)
- Wysoki poziom bilirubiny jest toksyczny szczególnie dla układu nerwowego wywołując:
 - * sztywność, napady drgawkowe, letarg, śmierć
 - * atetozę, utratę słuchu, zespół Parinauda



żółtaczka noworodków

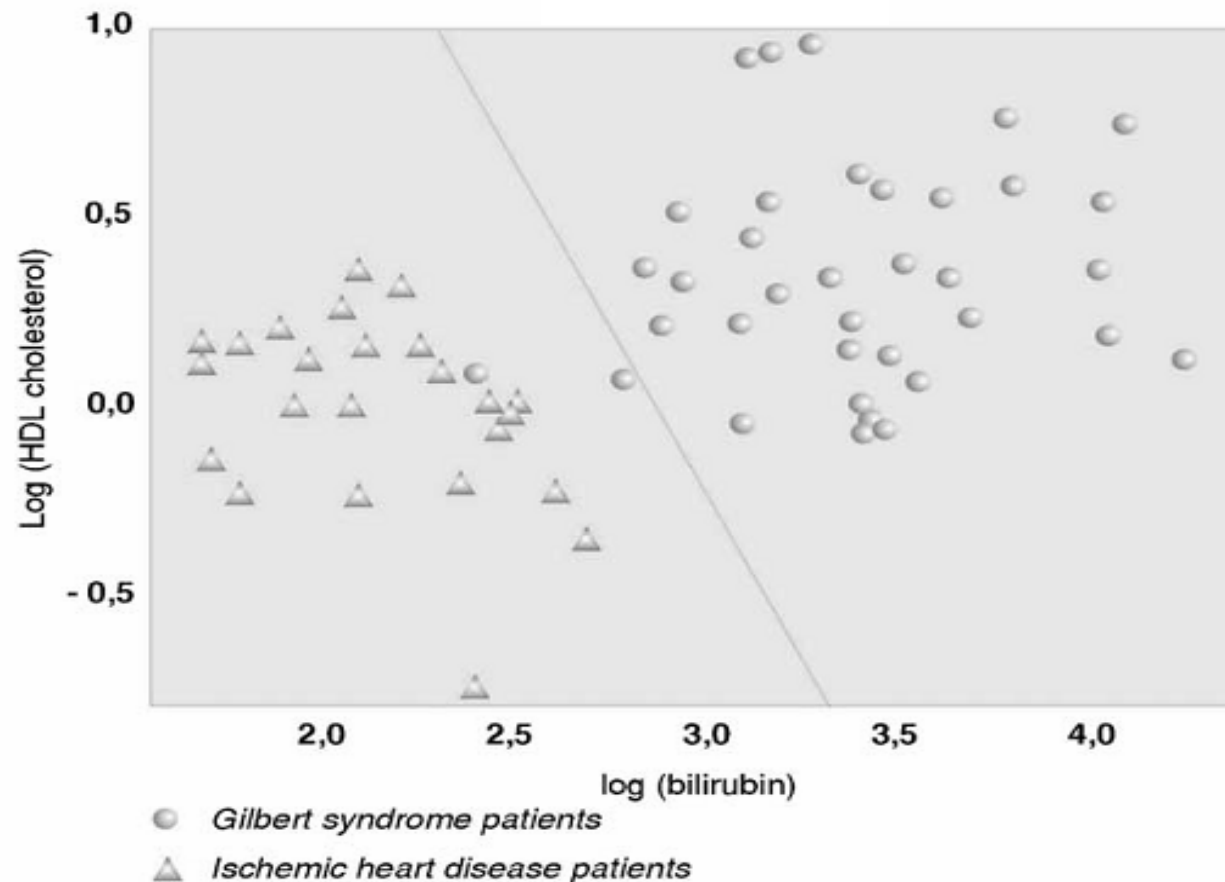
- Wysoki poziom bilirubiny indukuje apoptozę neuronów i komórek śródbłonna:





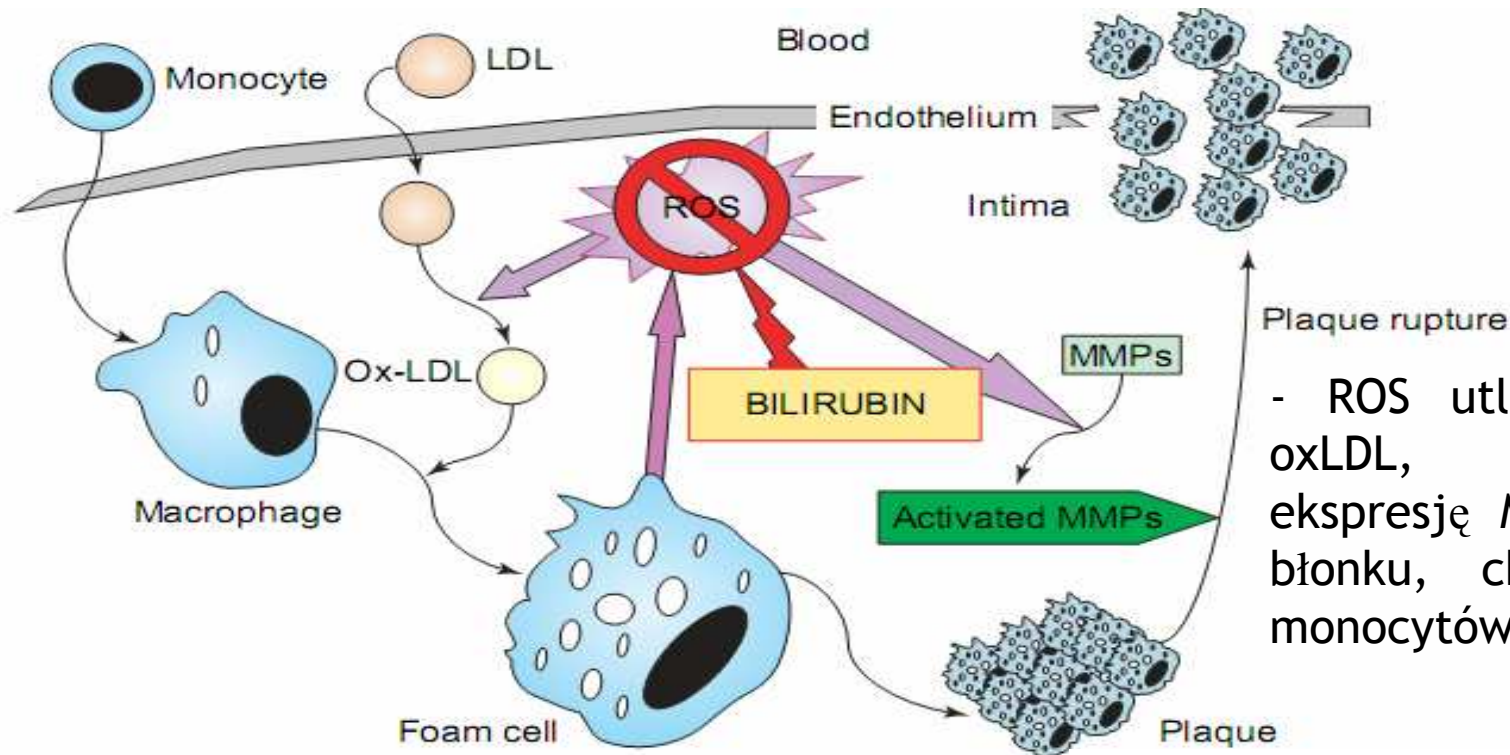
Bilirubina - znaczenie fizjologiczne

Pacjenci z syndromem Gilberta (czyli z wysokim poziomem bilirubiny spowodowanym niedoborem UDP-glukuronosylotransferazy bilirubiny UGT1A1 w wątrobie) rzadziej chorują na chorobę niedokrwinną serca. Poziom bilirubiny może być czynnikiem prognostycznym, niezależnym od poziomu HDL (choć może chronić HDL przed utlenieniem).





Przeciwmiążdżycowe działanie bilirubiny



- ROS utleniają LDL do oxLDL, co indukuje ekspresję MCP-1 na śródbłonku, chemoatraktanta monocytów.

- Monocyty migrują do intymy, gdzie fagocytują oxLDL, co nasila produkcję ROS i może prowadzić do przekształcania makrofagów w komórki piankowate.
- Bilirubina zmiatając ROS zmniejsza utlenianie LDL i ogranicza powstawanie komórek piankowatych; hamuje też aktywność MMP zmniejszając ryzyko pęknięcia blaszki miażdżycowej.





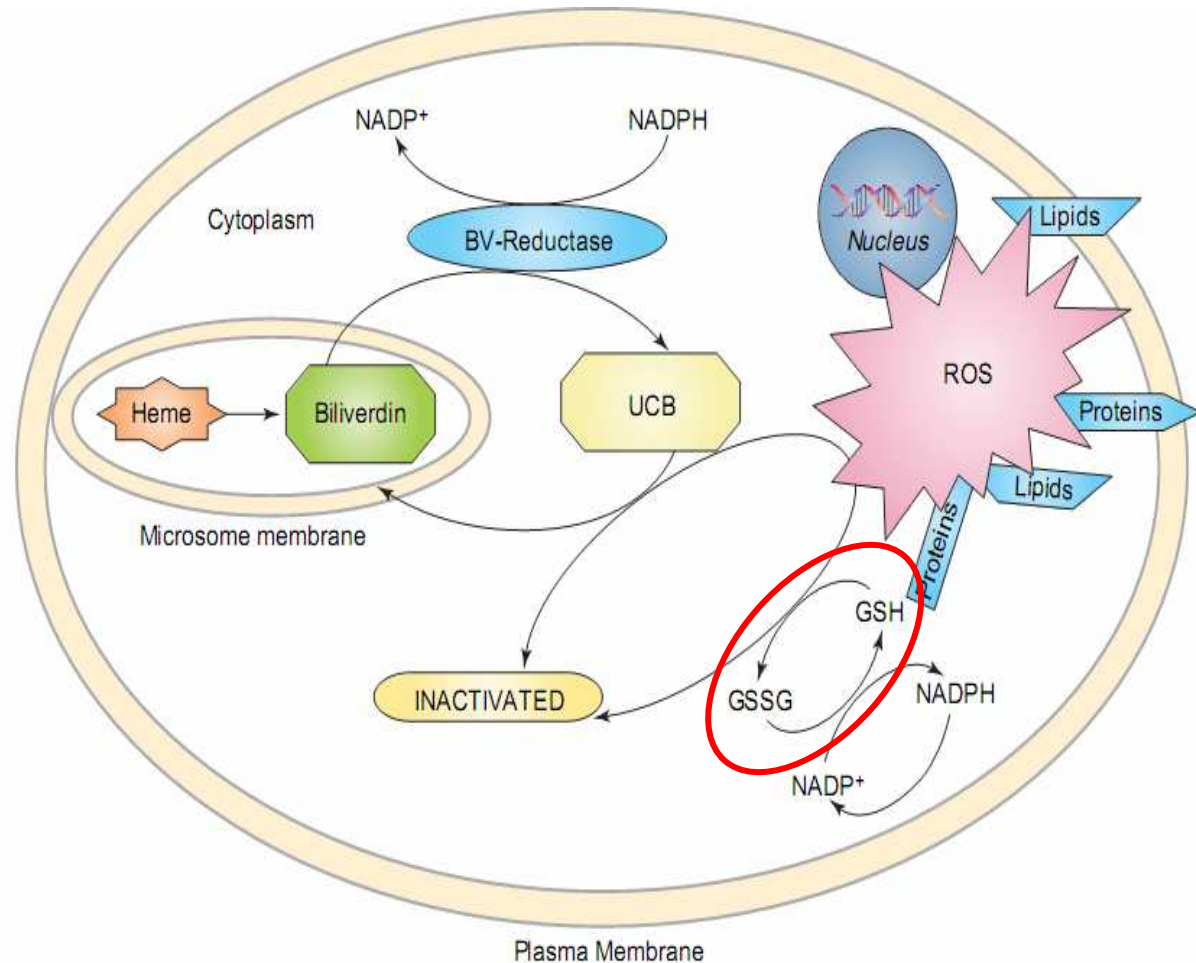
Bilirubina - znaczenie fizjologiczne

Cytoprotekcyjne właściwości bilirubiny i glutationu

- Wolna bilirubina (UCB) i glutation (GSH) działają jako zmiatacze ROS, ulegając utlenieniu do biliwerdyny i GSSG.

- Regeneracja bilirubiny jest katalizowana przez BvR (reduktazę biliwerdyny), a regeneracja glutationu przez GR (reduktazę glutationu).

- Regeneracja jest szczególnie istotna w przypadku bilirubiny, która w komórkach występuje w stężeniach nanomolowych (GSH - w milimolowych)





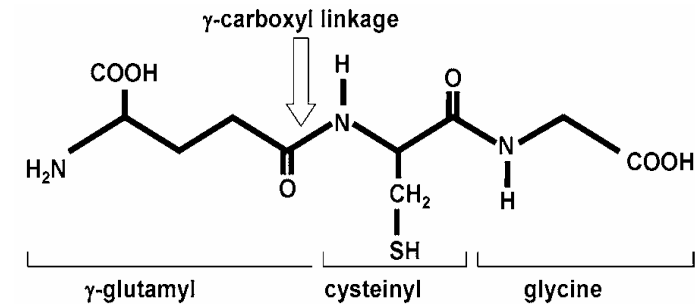
GSH i GSSG

Struktura formy tiolowej (zredukowanej) i dwusiarczkowej (utlenionej) glutationu

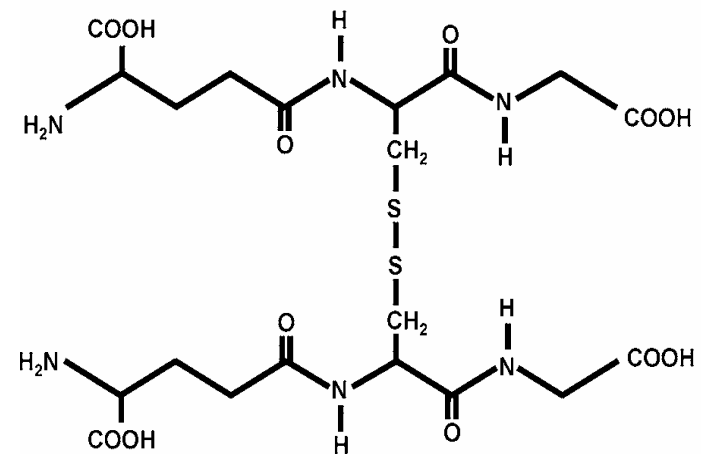
- Glutation: tripeptyd (L- γ -glutamylo-L-cysteinylo-glicyna) rozpuszczalny w wodzie. W wyniku utlenienia tworzy dimer połączony mostkiem dwusiarczkowym. W warunkach spoczynkowych >98% glutationu to forma GSH. Stosunek GSH:GSSG może się bardzo zmieniać w stresie oksydacyjnym. Część glutationu tworzy koniugaty z białkami.

- Stężenie glutationu w komórkach ssaków to 1-10 mM. W płynach zewnątrzkomórkowych 1-5 μ M (w żółci znacznie wyższe).

- W obu formach glutationu wiązanie peptydowe między N-końcowym glutaminianem i cysteiną jest wiązaniem z grupą γ -karboksylową, co chroni glutation przed degradacją przez aminopeptydazy surowicy lub proteazy komórkowe.



Glutathione (GSH)



Glutathione disulfide (GSSG)

GSH:GSSG - miara statusu oksydoredukcyjnego komórki





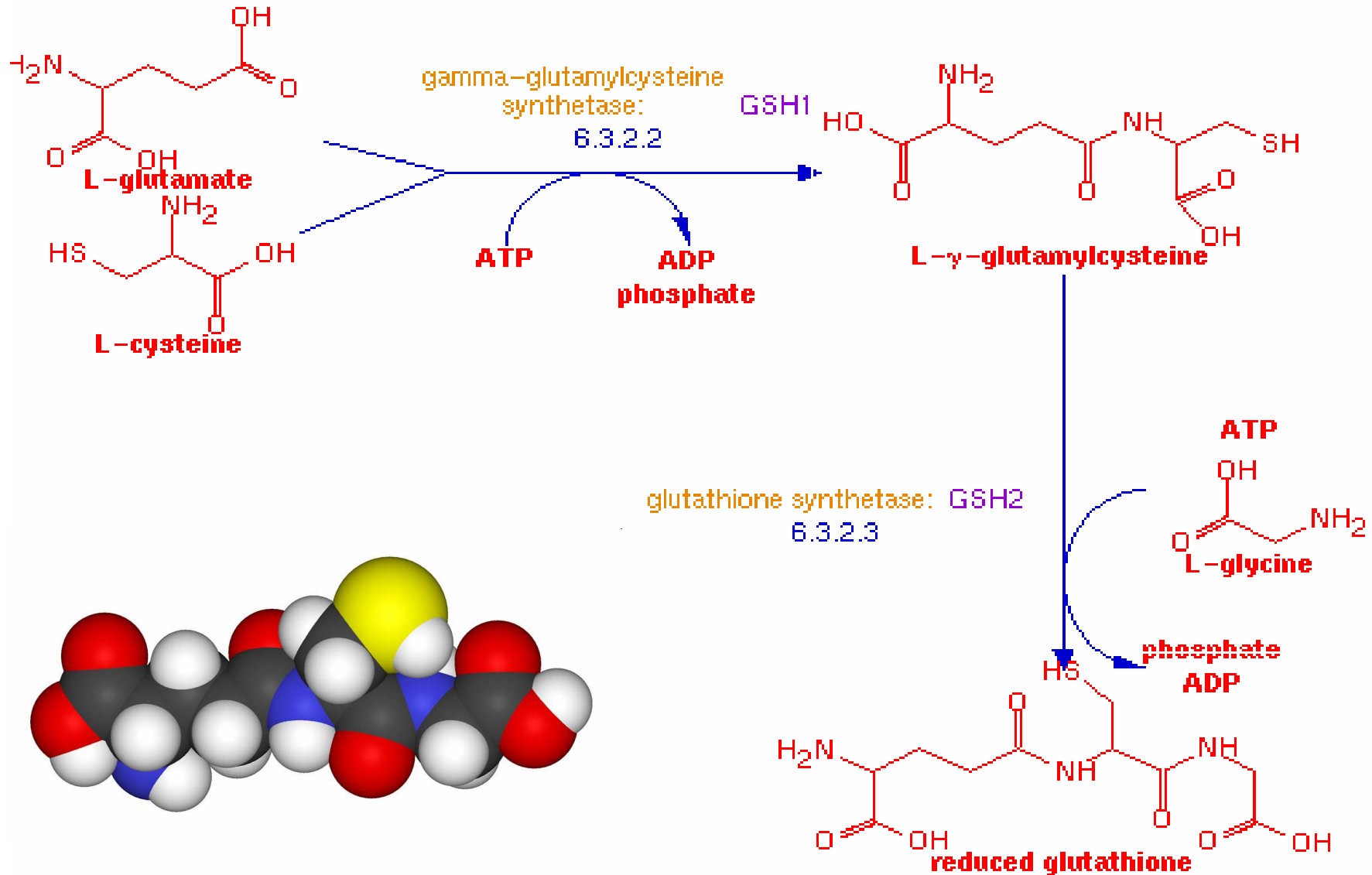
Antyoksydacyjne działanie glutationu

- Glutation jest zmiataczem reaktywnych form tlenu, neutralizującym między innymi nadtlenek wodoru i nadtlenki lipidów.
- Jest substratem dla:
 - * peroksydaz glutationowych (GPx): produkcja GSSG przez GPx prowadzi do utworzenia mieszaniny dwusiarczków białek komórkowych (białek S-glutationylowanych, PSSG); nadmiar GSSG jest uwalniany na zewnątrz komórki lub redukowany do GSH przez reduktazę glutationu zależną od NADPH.
 - * S-transferaz glutationowych
- Niedobór glutationu jest uzupełniany przez syntezę *de novo* w wyniku dwóch reakcji katalizowanych przez:
 - * ligazę γ -glutamylo-cysteinową
 - * syntazę glutationową
- H_2O_2 i nadtlenki lipidów są neutralizowane również przez:
 - * katalazy w peroksysomach
 - * peroksyredoksyny w cytoplaźmie, mitochondriach, peroksysomach i retikulum



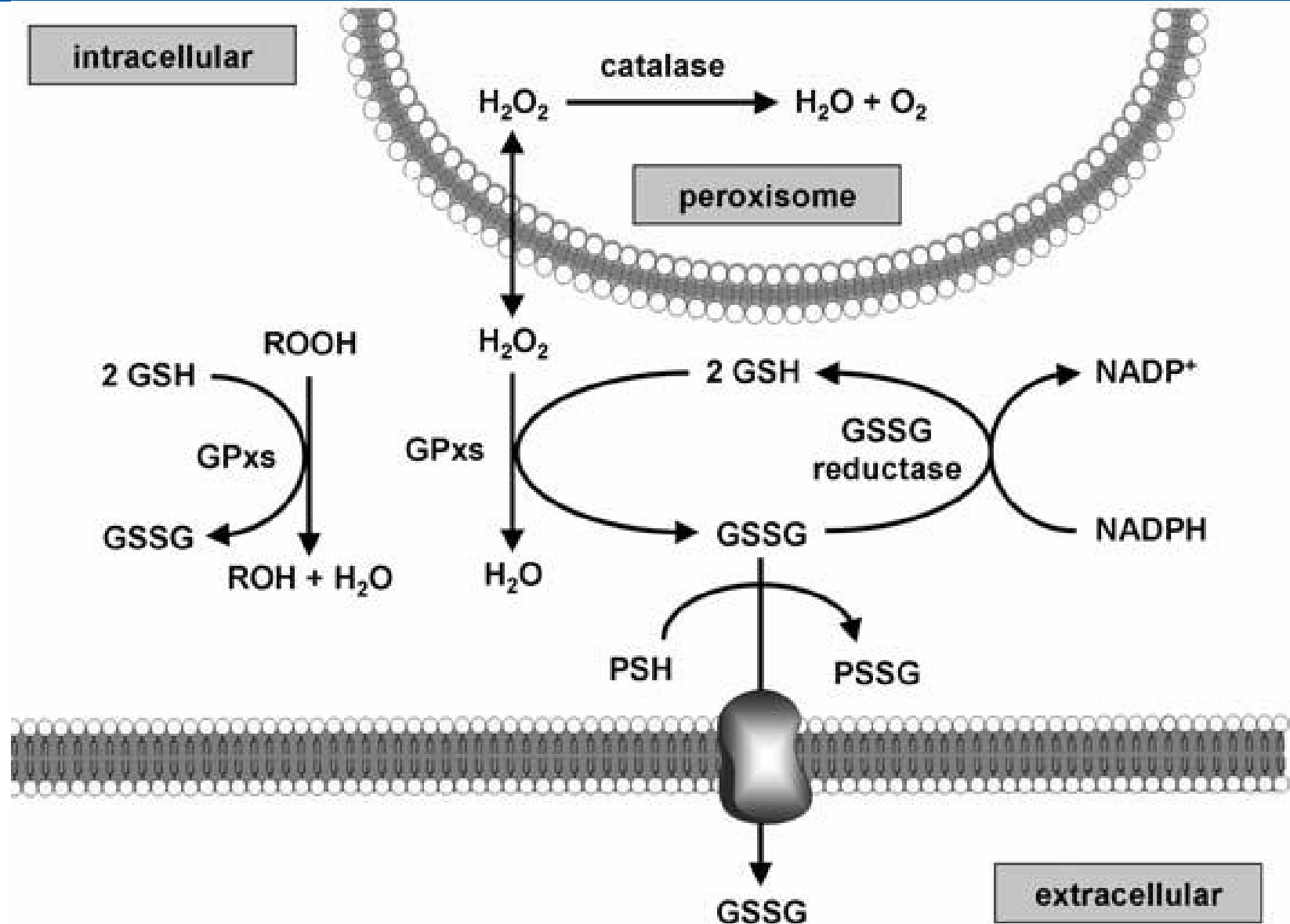


Synteza glutationu





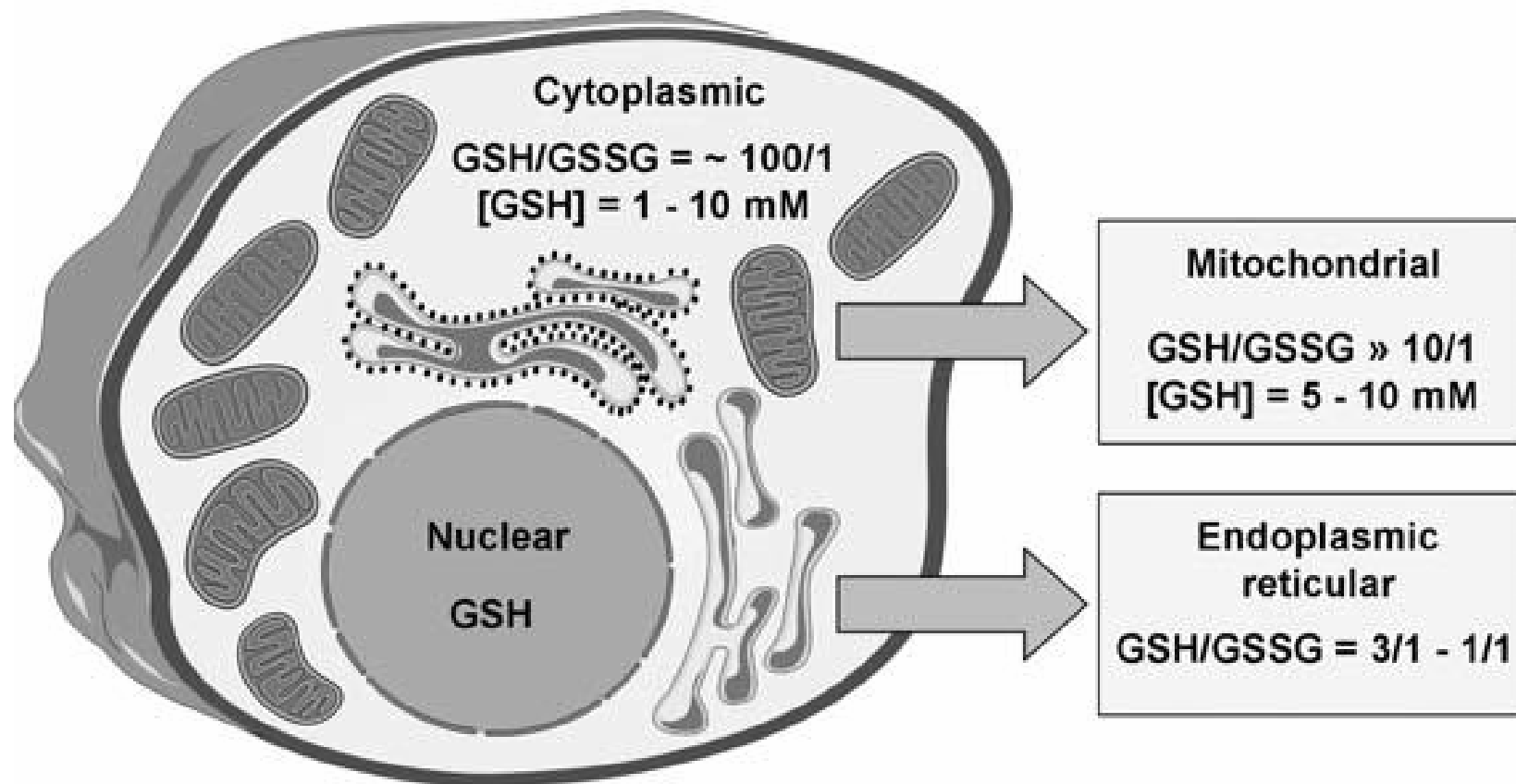
Antyoksydacyjne działanie glutationu





Lokalizacja glutationu

- Glutathion występuje we wszystkich kompartmentach komórki:
 - * ~90% w cytozolu (1-10 mM), tylko tu zachodzi synteza glutationu
 - * ~10% w mitochondriach (5-10 mM)
 - * niewiele w retikulum i jądrze





Modyfikacje oksydacyjne białek

- Modyfikacje mogą zmieniać funkcje białek zawierających cysteiny w centrach aktywnych lub w miejscach regulatorowych
- Większość modyfikacji jest odwracalna. Mogą tworzyć się:
 - * w obrębie jednej cząsteczki (zmiany konformacyjne)
 - * między cząsteczkami (agregacja)
- Utlenienie jest wynikiem reakcji z:
 - * H_2O_2
 - * wolnymi rodnikami
 - * nadtlenoazotynem
 - * kwasem podchlorowym
- Wiązania są redukowane przez:
 - * tioredoksyny
 - * glutaredoksyny



często nieodwracalne uszkodzenia oksydacyjne

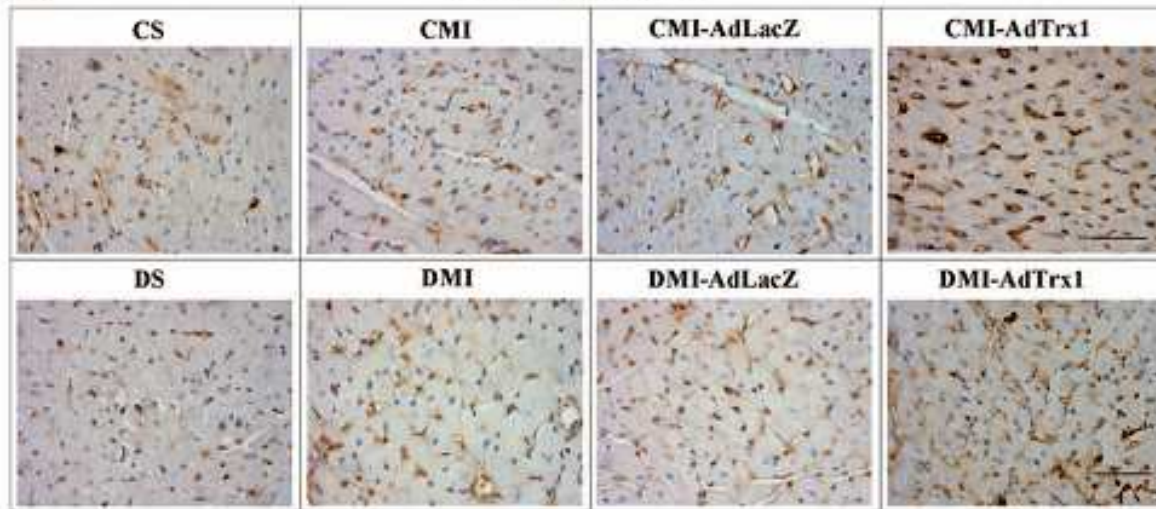




Współdziałanie białek antyoksydacyjnych

A

Trx1 Expression

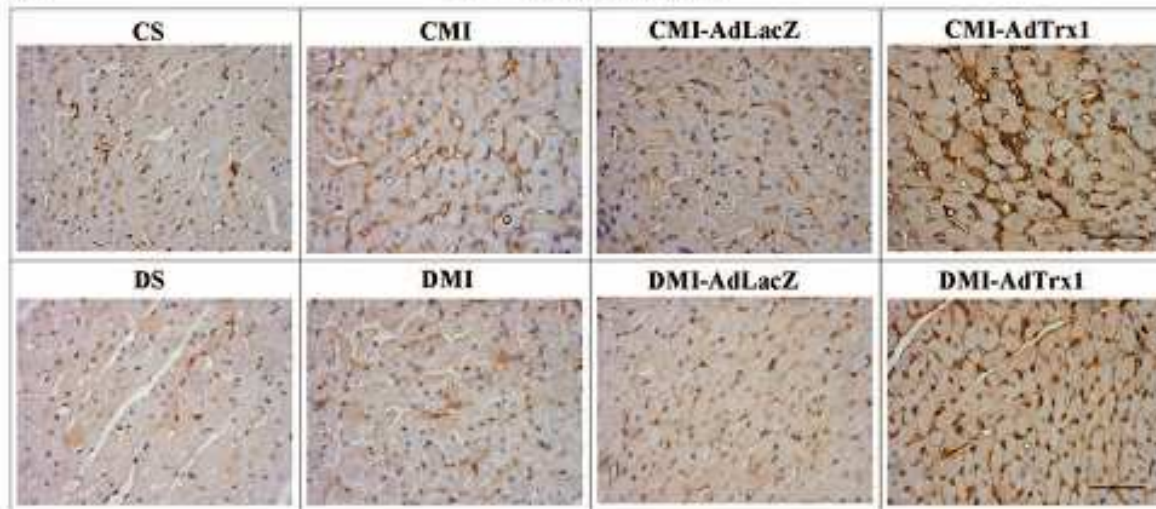


CS - szczury bez cukrzycy

DS - szczury z cukrzycą

B

HO-1 Expression



MI - zawał serca

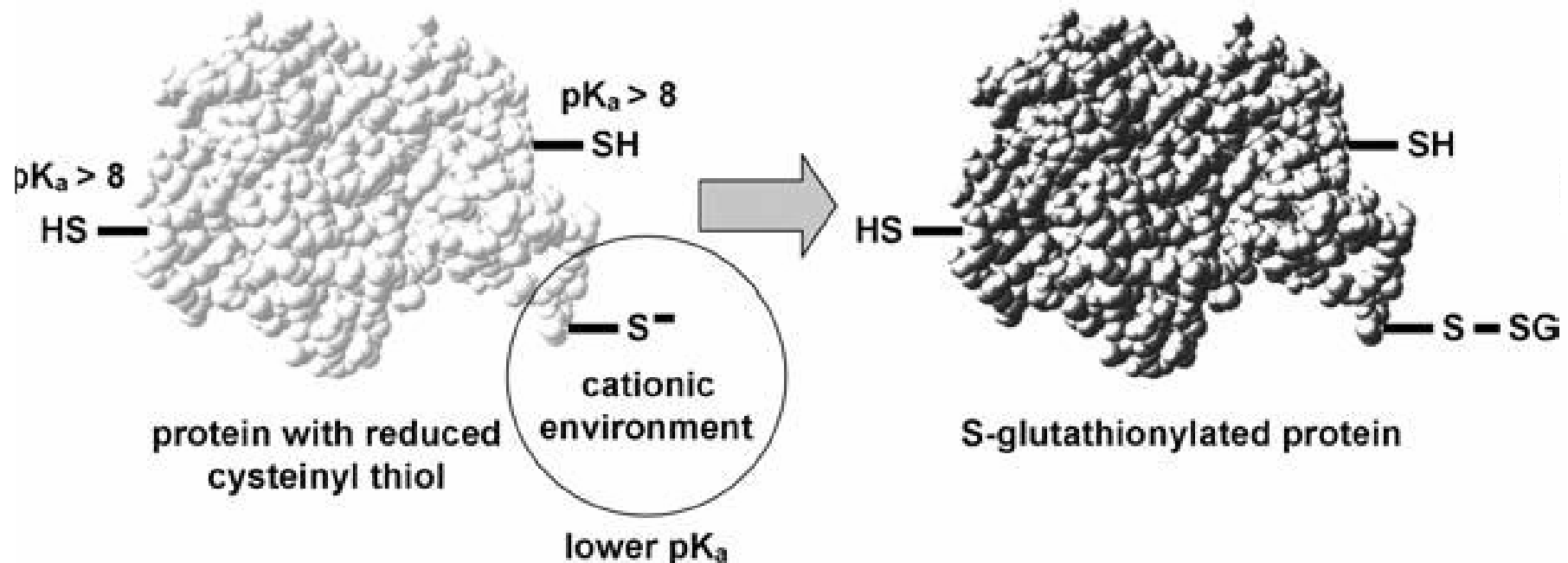
AdTrx1 - terapia genowa u szczurów
z wykorzystaniem wektorów
adenowirusowych i cDNA Trx1





Modyfikacje oksydacyjne białek

- Podatność reszt cyteinowych na reakcje redodoks zależy od:
 - * dostępności w cząsteczce
 - * aktywności, zależnej od sąsiadujących reszt aminokwasowych
- W pH obojętnym reszty cysteinowe białek nie są podatne na utlenienie. Cysteiny wrażliwe na utlenienie są otoczone resztami zasadowymi.
 - * przykład: fosfatazy tyrozynowe, gdzie cysteiny są w sąsiedztwie arginin i są utleniane w pH obojętnym; utlenienie hamuje aktywność fosfataz i może być odwracane przez tiole (zwłaszcza glutation)





S-glutathionylacja białek

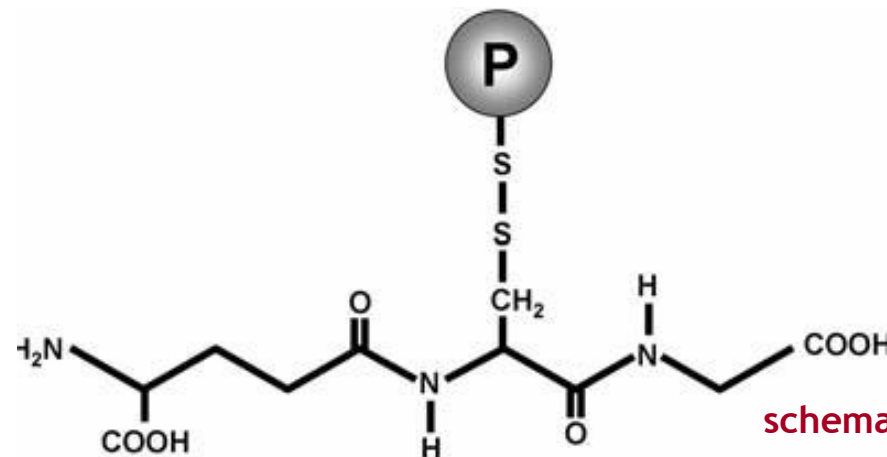
- Białka bardzo różnią się wrażliwością na S-glutathionylację:
 - * bardzo wrażliwym białkiem jest np. H-ras: glutathionylowane jest na kilku cysteinach; jednocześnie białko to jest bardzo wrażliwe na nitrację.
- W warunkach fizjologicznych reakcje S-glutathionylacji i nitracji są zbyt wolne dla większości reszt sulfohydrylowych. Mogą zostać jedna znacznie przyspieszone jeśli:
 - * reszty cysteinowe związane są z jonami Mg^{2+} , Zn^{2+} lub Ca^{2+} (z Zn^{2+} związane są regulatorowe cystein w niektórych izoformach kinazy białkowej C)
 - * reszty cysteinowe są otoczone resztami aminokwasowymi o ładunku dodatnim
- Wrażliwe na oksydację reszty cysteinowe są ważne w regulacji funkcji:
 - * izomeraz dwusiarczkowych
 - * fosfataz tyrozynowych
 - * kinazy kreatynowej
 - * GAPDH (dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego)
 - * peroksyredoksyn
- Podatne na utlenienie są reszty selenosysteinowe (Cys-SeH)





Modyfikacje oksydacyjne białek

- W stresie oksydacyjnym oprócz tworzenia pochodnych sulfinowych i sulfonowych (modyfikacji nieodwracalnych) powstaje nadmiar wiązań dwusiarczkowych, co może powodować:
 - * niewłaściwe fałdowanie białek
 - * agregację białek
- Redukcja wiązań w agregatach białkowych może być utrudniona.
- W warunkach doświadczalnych (hodowle in vitro) można doprowadzić do przesunięcia proporcji GSH:GSSG z ~1:100 nawet do 1:1. W warunkach fizjologicznych zwykle do tego nie dochodzi, ze względu na wydajny system eksportu GSSG na zewnątrz komórki. Dlatego nadmierne tworzenie wiązań dwusiarczkowych nie jest bardzo częste.



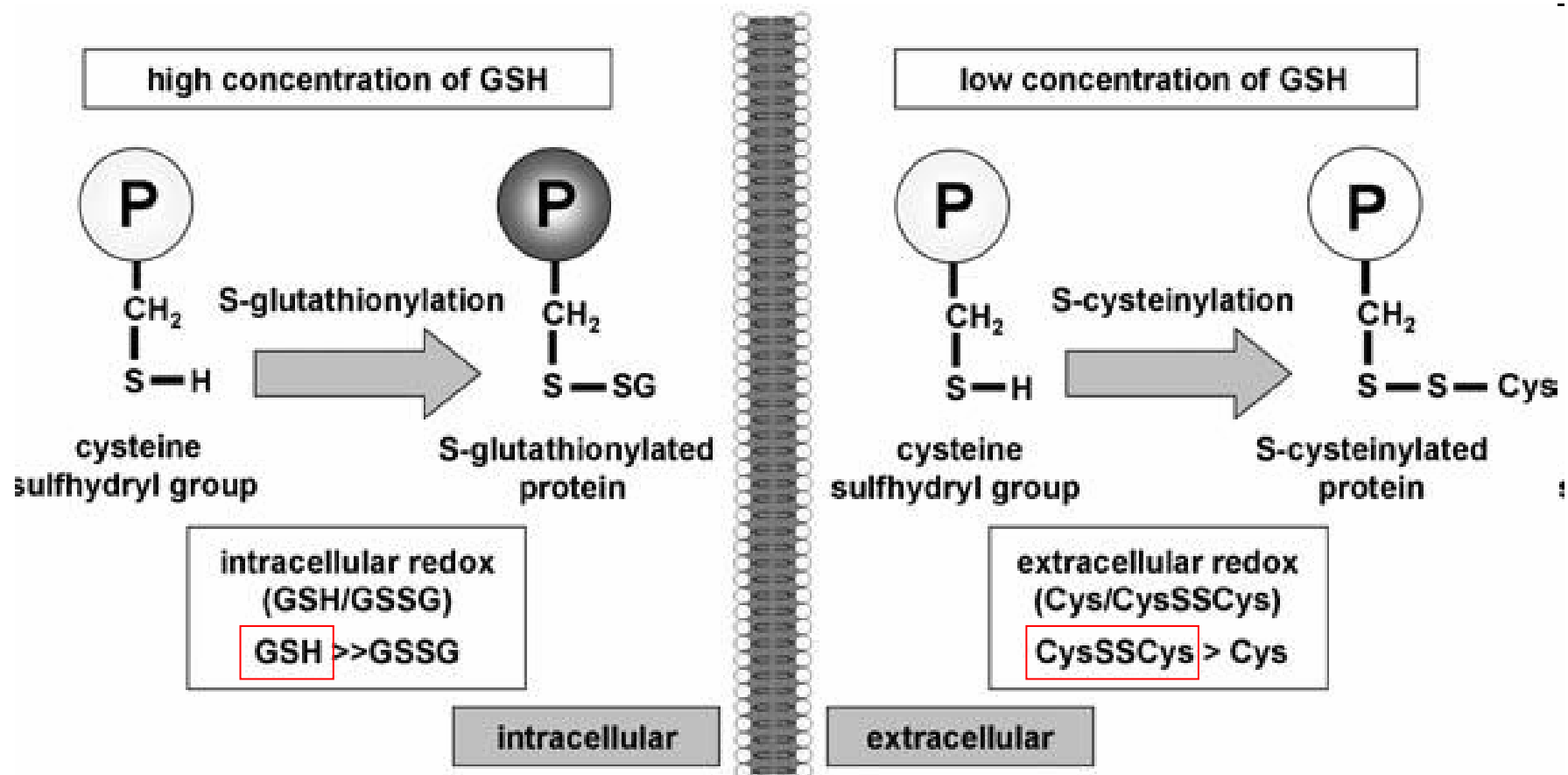
schemat białka S-glutationylowanego





Glutation wewnątrz- i zewnątrzkomórkowy

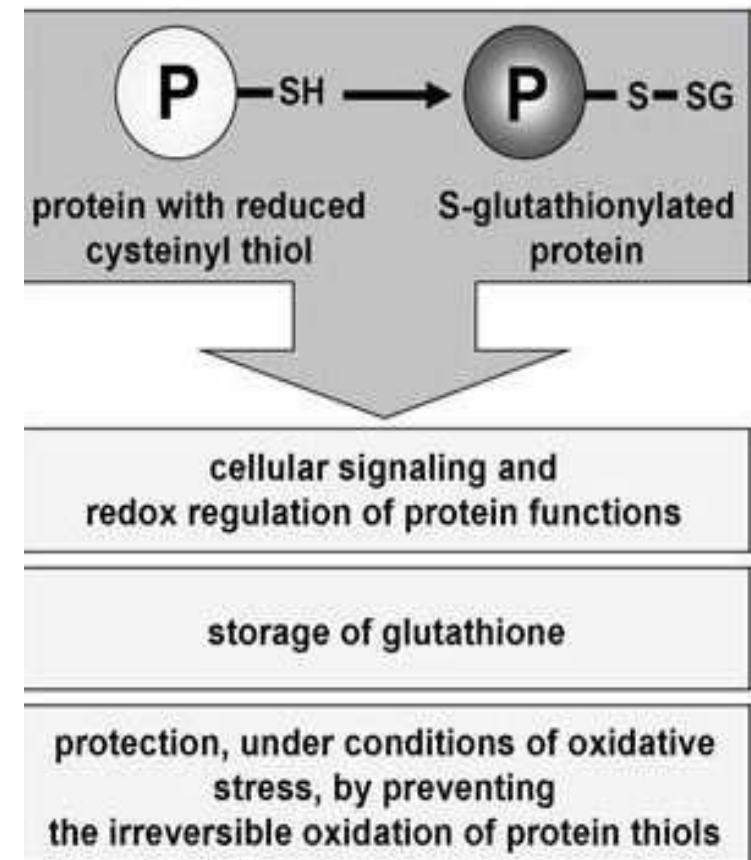
- Wewnątrzkomórkowe stężenie wolnych reszt cystein, cystyn, GSSG są niższe (μM) niż stężenie GSH (1-10 mM).
- Na zewnątrz komórek stężenie cystein i cystyn jest większe niż GSH.





S-glutathionylacja białek

- Modyfikacja post-translacyjna występująca w warunkach fizjologicznych:
 - * hemoglobina w erytrocytach
 - * γ -krystalina w soczewkach
 - * aktyna w fibroblastach i keratynocytach
- W warunkach fizjologicznych odgrywa funkcje regulatorowe i sygnalizacyjne.
- Jej najważniejszym efektem w stresie oksydacyjnym jest prawdopodobnie ochrona białek przed nieodwracalnymi zmianami oksydacyjnymi, nawet kosztem okresowego zmniejszenia aktywności enzymatycznej wynikającego np. ze zmian konformacyjnych.



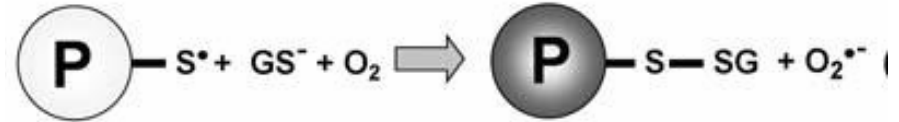


S-glutathionylacja białek: możliwe mechanizmy

reakcja reszty sulfhydrylowej z GSSG

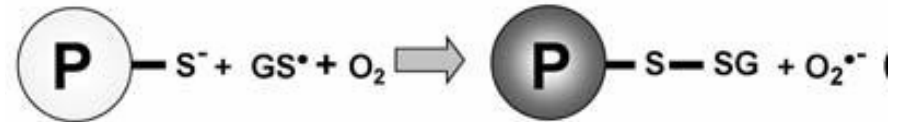


reakcja aktywowanej grupy tiolowej białka z GSSG

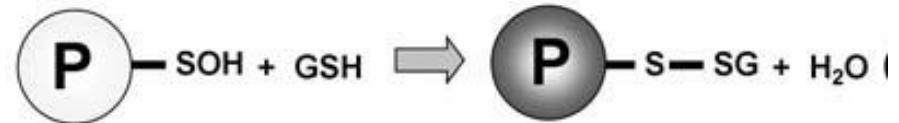


reakcja wolnorodnikowa lub utlenianie jednoelektronowe

reakcja grupy tiolowej białka z aktywowanym GSSG



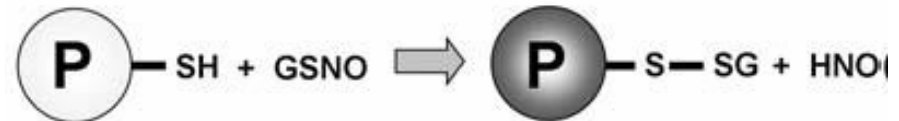
reakcja pochodnej sulfenikowej białka (wynik utlenienia dwuelektronowego grupy -SH) z GSH



reakcja grupy S-nitrozowej z GSH



reakcja grupy sulfhydrylowej z S-nitrozotiolami



reakcja grupy sulfhydrylowej z kwasem sulfinowym



protein with reduced
cysteiny l thiol

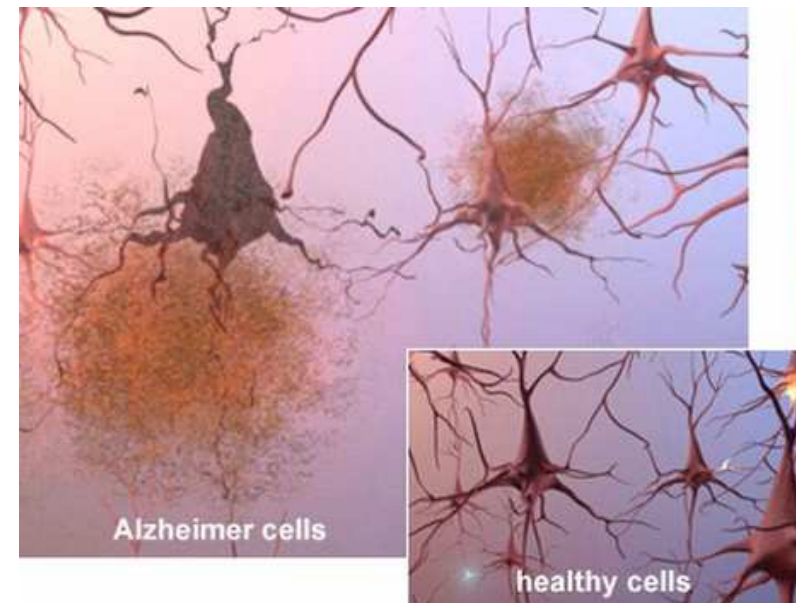
S-glutathionylated
protein





Glutation i S-glutationylacja w patogenezie chorób

- Obniżenie poziomu całkowitego glutationu i stosunku GSH:GSSG we krwi jest charakterystyczne dla wielu chorób. W tym:
 - * HIV (funkcje limfocytów T poprawiają się po suplementacji glutationem, replikacja wirusa jest szybsza w warunkach stresu oksydacyjnego)
 - * poważnych oparzeń
 - * cukrzycy typu 1 i 2
 - * marskości wątroby
 - * starczej, wysiękowej degeneracji plamki żółtej
 - * miażdżycy (już od wczesnego, asymptomatycznego stadium choroby)
 - * nadciśnienia
 - * chorobie Alzheimera (tu związane jest to z obniżeniem aktywności ligazy glutamylu cysteinyłowej)
 - * stwardnienia rozsianego



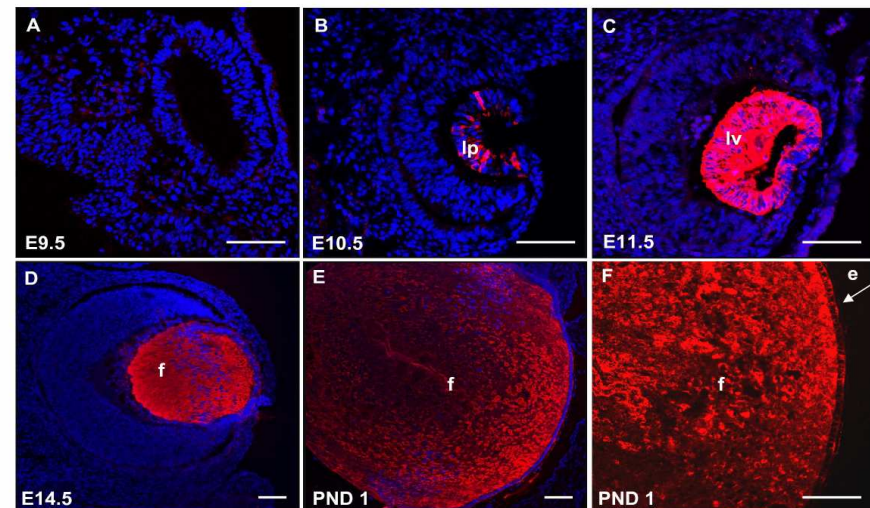


Glutation i krystalina

- Zmiany oksydacyjne w krystalinie soczewek mają duże znaczenie w zachowaniu jakości widzenia - soczewki muszą być przejrzyste.
- Krystalina (stanowi 90% białek soczewek) jest bogata w grupy sulfohydrylowe, a soczewki zawierają wysokie stężenia GSH. Uszkodzenia oksydacyjne krystaliny prowadzą do zmętnienia soczewek.
 - * α -krystalina jest heteromultimerem złożonym z dwóch typów podjednostek (α A i α B, każda o masie ok. 20 kDa)
 - * β -krystalina to rodzina zasadowych i kwasowych polipeptydów o masie ~23-35 kDa, tworzących różnorodne multimery 40-200 kDa.
 - * γ -krystalina ma masę ok. 20 kDa i występuje w formie monomerów.

- Białka te są bardzo długowieczne, a podlegając nieodwracalnym zmianom oksydacyjnym mogą akumulować się w soczewkach upośledzając widzenie. Zmiany takie obserwuje się już u ludzi dwudziestokilkuletnich.

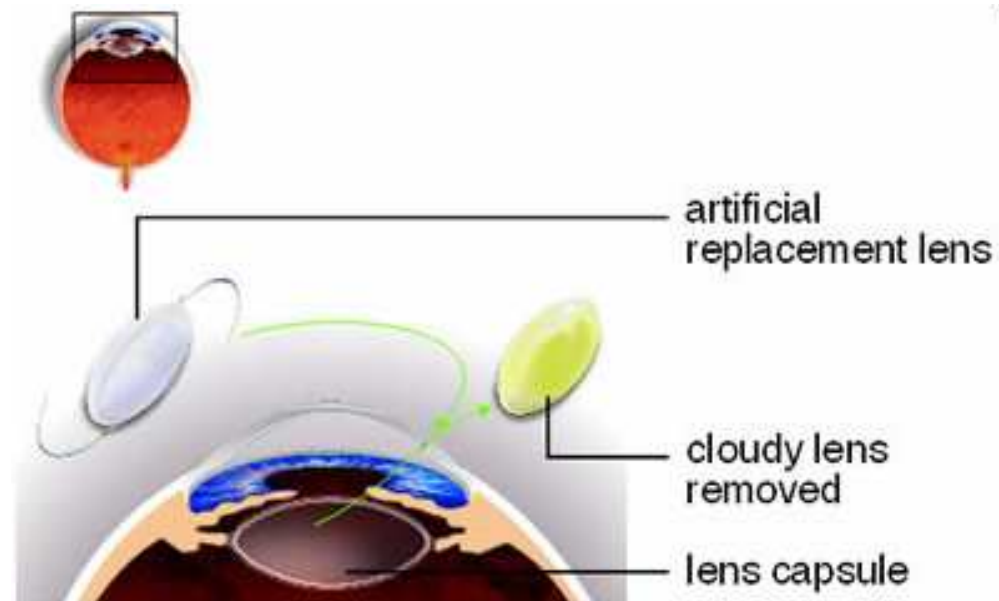
α -krystalina (czerwony) w rozwoju soczewki





Glutation i krystalina

- U osób starych akumulują się zmiany oksydacyjne reszt metioninowych i cysteinowych krystaliny.
 - * białka są niewłaściwie sfałdowane (to może aktywować reszty sulfhydrolowe)
 - * białka tworzą agregaty
- Uszkodzenia oksydacyjne białek i postępujący z wiekiem spadek stężenia GSH w soczewkach przyczynia się do tworzenia zaćmy.
 - * poziom całkowitego glutationu i stosunek GSH:GSSG jest niższy w soczewkach z zaćmą





JAGIELLONIAN UNIVERSITY
IN KRAKOW

Dziękuję

Slajdy dostępne na stronie Zakładu Biotechnologii Medycznej