

**Choroby XXI wieku –
diagnostyka, prewencja i leczenie**



Choroby XXI wieku – diagnostyka, prewencja i leczenie

Redakcja:
Alicja Danielewska
Izabela Mołdoch-Mendoń

Lublin 2022

**Wydawnictwo Naukowe TYGIEL składa serdeczne podziękowania
zespółowi Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje
oraz merytoryczne wskazówki dla Autorów.**

Recenzentami niniejszej monografii byli:

- prof. dr hab. n. med. Joanna Domagała-Kulawik
- dr hab. Sebastian Gnat, prof. UP
- dr hab. n. med. Krzysztof Kanecki
- dr hab. n. farm. Ewa Kędzierska
- dr hab. n. o. zdr. Edyta Krzych-Fałta
- dr n. med. Robert Błaszczak
- dr n. med. i n o zdr. Ruth Karolina Dudek-Wicher
- dr n. o zdr. Mariola Janiszewska
- dr Cecylia Jendyk
- dr n. o zdr. Marta Kowalska
- dr n. med. Wioleta Kowalska
- dr n. farm. Agnieszka Marzec
- dr Jolanta Orzelska-Górka
- dr Lidia Zapór

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:

Monika Maciąg

Projekt okładki:

Marcin Szklarczyk

Korekta:

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ISBN 978-83-67104-55-5

Wydawca:

Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin

www.wydawnictwo-tygiel.pl



Spis treści

Patrycja Piłat, Gabriela Szpila, Grzegorz K. Jakubiak Kierunki rozwoju farmakoterapii hiperurykემii	7
Rafał Fiolka, Dominika Szkodny, Alicja Gospodarczyk, Edward Wylęgała Rola cytokin w rozwoju i przebiegu dystrofii śródbrzońka rogówki	18
Anna Głowacka Przeciwciała monoklonalne – leczenie biologiczne w terapii ciężkiej astmy oskrzelowej w Polsce	26
Dominika Błażkowska, Patrycja Borecka, Klaudia Czarnul, Aleksandra Czarnecka Niezmienne limfocyty T związane z błoną śluzową – MAIT (<i>mucosal associated invariant T cells</i>) – udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej.....	44
Martyna Janicka, Magdalena Patrycy, Marcin Chodkowski, Małgorzata Krzyżowska Nanocząstki metali szlachetnych i ich wpływ na funkcjonowanie komórek układu nerwowego	54
Bartosz Ostrowski, Beata Krawczyk Metody metagenomiczne w badaniu mikrobiomu jelitowego człowieka.....	66
Anna Surtel, Małgorzata Kiernicka, Joanna Wysokińska-Miszczuk Ocena preparatu Parosin® w niechirurgicznym leczeniu zapalenia przyzębia na podstawie wybranych parametrów periodontologicznych	76
Justyna Suwara Powrót do przeszłości: nowe życie starych leków w terapiach antynowotworowych dzięki wykorzystaniu nowoczesnych systemów ich dostarczania.....	87
Dorota Nieciecka Wpływ leku pemetreksed i jego nośnika na strukturę membran białkowo-lipidowych	101
Gabriela Szpila, Patrycja Piłat, Grzegorz K. Jakubiak Przeciwciała monoklonalne w leczeniu dyslipidemii – aktualne możliwości.....	113
Agnieszka Vogt, Małgorzata Ostrowska Techniki stosowane do analizy mikrobiomu osób z fenylketonurią.....	124
Eliza Mędrék, Kamila Koseska, Paulina Zegarska, Grażyna Gromadzka Cukrzyca MODY: heterogenność genetyczna, metaboliczna i kliniczna	137
Paulina Zegarska, Natalia Brzozowska, Maria Bandykowska, Eliza Mędrék Cukrzyca, otyłość i przewlekłe nadciśnienie tętnicze jako czynniki ryzyka stanu przedrzucawkowego w ciąży.....	144



Justyna Kubacka, Anna Stefańska Znaczenie wybranych aminokwasów w zaburzeniach metabolicznych.....	152
Dawid Pajor, Mateusz W. Wylaź Epidemia odry (ang. <i>rubeola</i>) jako realne zagrożenie – analiza problemu spadku liczby szczepień przeciwko chorobom zakaźnym	163
Ewelina Jałonica, Urszula Ścisłowska, Grażyna Gromadzka E-papierosy – wpływ na układ odpornościowy, ryzyko infekcji i odpowiedź poszczepienną	170
Indeks Autorów	183

Kierunki rozwoju farmakoterapii hiperurykემii

1. Wstęp

Według wytycznych *American College of Rheumatology* hiperurykemia jest definiowana jako stężenie kwasu moczowego w surowicy równe co najmniej 6,8 mg/dl. Stwierdzono, że hiperurykemia jest związana ze zwiększonym ryzykiem rozwoju dny moczanowej, kamicy nerkowej, przewlekłej choroby nerek oraz chorób układu sercowo-naczyniowego [1]. Ponadto, ze zwiększoną częstością występuje w przebiegu takich chorób, jak: choroby limfoproliferacyjne i mieloproliferacyjne, choroba nowotwora, zwłaszcza w trakcie chemioterapii lub radioterapii (zespół lizy guza), a także czerwienica prawdziwa [2]. Hiperurykemia występuje częściej u osób o dużym ryzyku sercowo-naczyniowym, u kobiet po menopauzie, u osób rasy innej niż biała oraz u osób w wieku podeszłym. W ciągu ostatnich lat częstość występowania hiperurykემii wzrosła, co może być spowodowane zmianą nawyków żywieniowych i stylu życia, związanych z rosnącym statusem społeczno-ekonomicznym społeczeństwa w wielu krajach [3, 4].

Kwas moczowy jest końcowym produktem katabolizmu puryn i powstaje w reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową, która zachodzi głównie w jelicie i wątrobie [5, 6]. Wydalanie kwasu moczowego następuje głównie przez nerki, jednakże większość kwasu moczowego przesączonego w kłębuszkach nerkowych ulega reabsorpcji w kanałkach proksymalnych przez transporter kwasu moczowego 1 (URAT1, ang. *uric acid transporter 1*), zaś w mniejszym stopniu za pośrednictwem transporterów GLUT9 (ang. *glucose transporter 9*) oraz transporterów OAT (ang. *organic anion transporter*). Blokowanie tych transporterów (w szczególności URAT1) prowadzi do zahamowania reabsorpcji kwasu moczowego z moczu pierwotnego oraz wzrostu jego stężenia w moczu ostatecznym (działanie urykozurycnie), co prowadzi do obniżenia stężenia kwasu moczowego we krwi [7].

Do leków obniżających stężenie kwasu moczowego we krwi, stosowanych w rutynowej praktyce klinicznej, należą inhibitory oksydazy ksantynowej, inhibitory URAT1 (leki urykozurycne) oraz preparaty rekombinowanej oksydazy moczanowej (leki urykolytyczne) [8]. Obecnie stosowane inhibitory oksydazy ksantynowej (allopuryinol, febukstostat) czasami wywołują ciężkie działania niepożądane, takie jak zespół Stevensa-Johnsona, martwica toksyczno-rozplywna naskórka i zespół nadwrażliwości na allopuryinol. Podczas stosowania leków urykozurycznych istnieje natomiast obawa powstania złożeń w drogach moczowych i upośledzenia czynności nerek. Niezbędne jest zatem

¹ pilat.patrycja91011@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe, Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Angiologii i Medycyny Fizykalnej w Bytomiu, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.angiomedfiz.sum.edu.pl

² gabrielaszpila99@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe, Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Angiologii i Medycyny Fizykalnej w Bytomiu, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.angiomedfiz.sum.edu.pl

³ grzegorz.k.jakubiak@gmail.com, Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Angiologii i Medycyny Fizykalnej w Bytomiu, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.angiomedfiz.sum.edu.pl

poszukiwanie nowych, bardziej skutecznych i bezpiecznych leków obniżających stężenie kwasu moczowego [9, 10].

W ramach terapii hiperurykემii istotną rolę odgrywa również dieta z ograniczeniem podaży pokarmów bogatopurynowych, takich jak mięso, podroby, owoce morza, a także substancji nasilających katabolizm nukleotydów, do których należy fruktoza oraz alkohol. Utrzymywanie prawidłowej masy ciała jest również istotne, ponieważ wykazano, że nadwaga i otyłość zwiększa ryzyko wystąpienia hiperurykემii. Warto również starannie rozważyć wskazania do stosowania leków, które sprzyjają wzrostowi stężenia kwasu moczowego we krwi, takich jak: diuretyki tiazydowe, niektóre leki przeciwdrgawkowe (walproinian i fenobarbital), cyklosporyna, teofilina, pirazynamid i kwas acetylosalicylowy [11-13].

Celem niniejszej pracy jest przeprowadzenie przeglądu literatury oraz przedstawienie najważniejszych informacji na temat wyników wybranych badań klinicznych i przedklinicznych, dotyczących substancji badanych pod kątem ewentualnego zastosowania w leczeniu hiperurykემii.

2. Wyniki badań klinicznych

2.1. Dotinurad

Dotinurad jest selektywnym inhibitorem transportera URAT1. W 2019 roku opublikowano wyniki dwunastotygodniowego, randomizowanego, wieloośrodkowego badania klinicznego drugiej fazy, z podwójnie ślełą próbą, kontrolowanego placebo, w grupach równoległych, z eskalacją dawki. Dotinurad zastosowano w dawkach 0,5, 1, 2 lub 4 mg. Pierwszorzędowym punktem końcowym była procentowa zmiana stężenia kwasu moczowego w surowicy, mierzona od wizyty początkowej do wizyty końcowej. Drugorzędowym punktem końcowym był odsetek pacjentów, którzy podczas wizyty końcowej uzyskali stężenie kwasu moczowego w surowicy mniejsze lub równe 6 mg/dl. W badaniu uczestniczyło dwustu Japończyków z hiperurykemią, wśród których były osoby z rozpoznaną dną moczanową oraz bez rozpoznanej dny moczanowej. Wśród osób stosujących dotinurad w dawce 0,5 mg, 1 mg, 2 mg i 4 mg stężenie kwasu moczowego we krwi uległo zmniejszeniu odpowiednio o 21,81%, 33,77%, 42,66%, 61,09%, zaś w grupie osób otrzymujących placebo uległo zwiększeniu o 2,83%. W grupach badawczych odsetek pacjentów, którzy osiągnęli stężenie kwasu moczowego w surowicy nie wyższe niż 6 mg/dl na ostatniej wizycie, wynosił odpowiednio 23,1%, 65,9%, 74,4%, i 100%, według rosnącej dawki leku, natomiast w grupie kontrolnej drugorzędowy punkt końcowy nie został osiągnięty przez żadnego z uczestników badania. Częstość występowania zdarzeń niepożądanych nie wzrastała istotnie wraz ze wzrostem dawki wśród osób przyjmujących dotinurad. Nie zaobserwowano istotnych różnic w częstości występowania zapalenia stawów w przebiegu dny moczanowej pomiędzy grupami [14].

W innym badaniu dodatkowo porównano skuteczność dotinuradu z febuksostatem. Było to wieloośrodkowe, randomizowane badanie kliniczne z podwójnie ślełą próbą, w grupach równoległych. Leczenie w grupach osób otrzymujących dotinurad i febukostat rozpoczęto od dawki dobowej odpowiednio 0,5 mg i 10 mg, a następnie zwiększano dawkę dobową odpowiednio do 2 mg i 40 mg przez czternaście tygodni. Do badania włączono łącznie dwustu trzech pacjentów z hiperurykemią, z rozpoznaną dną moczanową lub bez, którzy zostali losowo przydzieleni do grupy otrzymującej

dotinurad lub febuksostat (odpowiednio sto dwie osoby oraz sto jeden osób). Procentowa zmiana stężenia kwasu moczowego w surowicy, mierzona od wizyty początkowej do wizyty końcowej, wyniosła 41,82% w grupie osób przyjmujących dotinurad i 44,00% w grupie osób przyjmujących febuksostat. Potwierdzono równoważność dotinuradu z febuksostatem pod względem działania obniżającego stężenie kwasu moczowego w surowicy. Nie stwierdzono wystąpienia żadnych poważnych działań niepożądanych [15].

W innym badaniu, które trwało pięćdziesiąt osiem tygodni, zweryfikowano skuteczność i bezpieczeństwo stosowania dotinuradu przez trzystu trzydziestu pacjentów z hiperurykემią, z rozpoznaną dną moczanową lub bez. Dawka dotinuradu rozpoczęła się od 0,5 mg na dobę i była stopniowo zwiększana do 2 mg na dobę. Jeżeli stężenie kwasu moczowego w surowicy pacjenta w czternastym tygodniu nie osiągnęło wartości niższej niż 6 mg/dl, dawkę zwiększano do 4 mg na dobę. Po stosowaniu leku w dawce 2 mg stężenie kwasu moczowego w surowicy w trzydziestym czwartym i pięćdziesiątym ósmym tygodniu zmniejszyło się odpowiednio o 46,73% i 47,17%, zaś po zastosowaniu leku w dawce 4 mg odpowiednio o 54,92% i 57,35%. Po zakończeniu badania odsetek pacjentów, którzy osiągnęli stężenie kwasu moczowego w surowicy mniejsze niż 6 mg/dl przy dawce 2 mg, wynosił odpowiednio 89,11% i 91,30%, zaś przy 4 mg ten sam wskaźnik wynosił odpowiednio 97,50% i 100,00% [16].

2.2. Werinurad

Werinurad jest inhibitorem URAT1 stosowanym jednocześnie z inhibitorem oksydazy ksantynowej.

Celem pierwszego omawianego badania dotyczącego werinuradu, było zastosowanie opracowanego półmechanistycznego modelu ekspozycja-odpowiedź dla kinetyki kwasu moczowego, w celu uwzględnienia zmienności międzyosobniczej, w odniesieniu do werinuradu i jego kombinacji z inhibitorem oksydazy ksantynowej. Przeanalizowano dwanaście badań klinicznych, obejmujących łącznie czterystu trzydziestu czterech pacjentów, w tym osoby zdrowe, z hiperurykემią oraz osoby z zaburzeniami czynności nerek. Według tej pracy, wartości EC_{50} , czyli stężenie leku we krwi, przy którym osiąga on połowę maksymalnej efektywności w działaniu obniżającym stężenie kwasu moczowego we krwi, dla werinuradu, febuksostatu i oksypurynolu, wynosiły odpowiednio: 29, 128 i 13 030 mg/ml. Pacjenci z dną moczanową wykazywali wyższe EC_{50} w porównaniu ze zdrowymi ochotnikami, natomiast nie stwierdzono istotnej różnicy u pacjentów z bezobjawową hiperurykემią [7].

W drugim z analizowanych badań prowadzonych z użyciem werinuradu, ocenie podlegał wpływ dapagliflozyny dodanej do werinuradu i febuksostatu na wydalanie kwasu moczowego. Było to badanie randomizowane, kontrolowane placebo. W badaniu uczestniczyły osoby dorosłe z bezobjawową hiperurykემią. Trzydzieści sześć osób zostało losowo przydzielonych do stosowania doustnie 9 mg werinuradu, 80 mg febuksostatu i 10 mg dapagliflozyny raz na dobę przez siedem dni lub do drugiej grupy, w której podawano raz dziennie 9 mg werinuradu, 80 mg febuksostatu i placebo przez siedem dni. Stężenia kwasu moczowego były niższe w przypadku grupy otrzymującej dapagliflozynę niż w grupie otrzymującej placebo (średnia różnica wynosiła – 62,3 $\mu\text{mol/l}$). Nie stwierdzono klinicznie istotnych różnic w zakresie bezpieczeństwa leczenia [1].

2.3. DKB114

DKB114 to mieszanina ekstraktu z kwiatu *Chrysanthemum indicum* i *Cinnamomum cassia*. Badanie przeprowadzone z DKB114 było randomizowanym, dwunasto-tygodniowym, podwójnie zaślepionym badaniem kontrolowanym placebo. Łącznie w badaniu uczestniczyło osiemdziesiąt osób z bezobjawową hiperurykemią, w tym czterdzieści osób zostało włączonych do grupy badawczej i przyjmowało DKB114, zaś czterdzieści osób otrzymywało placebo. Nie zaobserwowano znaczącej różnicy między grupami osób otrzymujących DKB114 i placebo w zakresie stężenia kwasu moczowego w surowicy po sześciu tygodniach. Jednak po dwunastu tygodniach stężenie kwasu moczowego w surowicy osób z grupy osób otrzymujących DKB114 obniżyło się o $0,58 \pm 0,86$ mg/dl i wynosiło $7,37 \pm 0,92$ mg/dl, natomiast w grupie placebo zmniejszyło się o $0,02 \pm 0,93$ mg/dl i wynosiło $7,67 \pm 0,89$ mg/dl, a różnica była istotna statystycznie [17].

2.4. Glicyna i tryptofan

W randomizowanym, podwójnie zaślepionym, kontrolowanym placebo badaniu, trwającym szesnaście tygodni, zbadano wpływ codziennej suplementacji glicyny i tryptofanu na stężenie kwasu moczowego. W badaniu uczestniczyły osoby w wieku od 20 do 64 lat, ze stężeniem kwasu moczowego we krwi w zakresie od 6,6 mg/dl do 7,9 mg/dl. Do badania zakwalifikowano trzydzieści dwie osoby. Osoby zakwalifikowane do grupy badawczej przyjmowały 3,0 g glicyny i 0,2 g tryptofanu, zaś osoby zakwalifikowane do grupy kontrolnej przyjmowały placebo przez sześć tygodni. Stężenie kwasu moczowego w surowicy po zakończeniu badania uległo obniżeniu w grupie badawczej (7,1 mg/dl vs. 6,7 mg/dl; $p = 0,004$), natomiast w grupie kontrolnej nie zaobserwowano istotnych zmian. Według autorów badania, głównym mechanizmem działania preparatu zawierającego glicynę i tryptofan jest alkalizacja moczu, która zwiększa rozpuszczalność kwasu moczowego w moczu, a tym samym zwiększa jego wydalanie [18].

2.5. *Terminalia bellerica*

Standaryzowany wodny ekstrakt z *Terminalia bellerica* jest wytwarzany z jadalnych owoców i zawiera nie mniej niż 1% kwasu chebulinowego i nie mniej niż 15% innych hydrolizowalnych tanin o niskiej masie cząsteczkowej. Przeprowadzono trwające dwadzieścia cztery tygodnie prospektywne, randomizowane, podwójnie zaślepione, kontrolowane placebo badanie w grupach równoległych. Pięćdziesiąt osób, biorących udział w badaniu podzielono na trzy grupy, w których stosowano odpowiednio 40 mg febuksostatu raz dziennie, 500 mg ekstraktu *Terminalia bellerica* dwa razy dziennie oraz 1000 mg ekstraktu *Terminalia bellerica* dwa razy dziennie. Po dwudziestu czterech tygodniach średnie procentowe zmniejszenie stężenia kwasu moczowego we krwi wynosiło we wspomnianych grupach odpowiednio $63,70\% \pm 4,62\%$, $19,84\% \pm 6,43\%$ i $33,88\% \pm 4,95\%$ [19]. Chociaż z przedstawionych danych wynika, że skuteczność ekstraktu *Terminalia bellerica* jest mniejsza niż febuksostatu, to być może znajdzie zastosowanie jako preparat pochodzenia naturalnego, który może wspomagać farmakoterapię hiperurykemią.

3. Wyniki badań przedklinicznych

3.1. Izoorientyna

Izoorientyna (6-C-glukozyd luteoliny) jest naturalnym związkiem flawonoidowym, który został zidentyfikowany w takich roślinach, jak *Commelina communis*, *Crataegus pentagyna*, *Cymbopogon citratus*, *Cucumis sativus*, *Passiflora edulis* oraz *Oxalis corniculata* [20]. Izoorientyna obniża stężenie kwasu moczowego przez hamowanie aktywności oksydazy ksantynowej oraz wpływ na szlak sygnałowy inflamasyonu TLR4-NLRP3 (ang. *toll-like receptor 4 - NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*). W badaniu przeprowadzonym przez An i wsp. wykazano, że izoorientyna hamuje aktywność oksydazy ksantynowej zarówno *in vivo* (badanie na zwierzętach), jak również *in vitro* (badanie na hodowli komórkowej) [21].

3.2. Olsalazyna sodowa

Olsalazyna sodowa, pochodna kwasu 5-aminosalicylowego, jest lekiem stosowanym u chorych z rozpoznaniem wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego, który posiada również pewną aktywność inhibitora oksydazy ksantynowej. Wykazano, że olsalazyna sodowa w dawce 5 mg na kilogram masy ciała obniża stężenie kwasu moczowego w surowicy szczurów z hiperurykemią i zwiększa wydalanie moczanów. Stwierdzono, że olsalazyna sodowa wpływa na ekspresję genów kodujących niektóre transportery, uczestniczące w regulacji wydalania kwasu moczowego [22].

3.3. Rekombinowany wariant PASylowanej oksydazy moczanowej

Preparat rekombinowanej oksydazy moczanowej (rasburykaza) jest obecnie stosowany w leczeniu hiperurykემii w przebiegu zespołu rozpadu nowotworu w trakcie chemioterapii. Chociaż rasburykaza jest skutecznym lekiem obniżającym stężenie kwasu moczowego we krwi, z jej stosowaniem wiążą się pewne ograniczenia, takie jak m.in. immunogenność oraz niekorzystne właściwości farmakokinetyczne. Najjri i wsp. opisali perspektywy poprawy właściwości rekombinowanej oksydazy moczanowej m.in. przez technikę PASylacji, w której sekwencje składające się z trzech aminokwasów (prolina, alanina, seryna), są wykorzystywane do sprzęgania z docelowym białkiem. Sekwencje PAS nie wykazują immunogenności, wydłużają okres półtrwania skoniugowanych leków terapeutycznych, zapewniają większą stabilność. Badacze opracowali preparat PASylowanej oksydazy moczanowej otrzymanej z *Aspergillus flavus*. Ponadto w badaniach *in vitro* uzyskano dane wskazujące na zadowalającą stabilność takiego preparatu, zaś w badaniach *in vivo* przeprowadzonych na szczurach udowodniono dłuższy okres półtrwania takiego preparatu w porównaniu z rasburykazą [23].

3.4. Poria cocos

Poria cocos jest grzybem, stosowanym w tradycyjnej medycynie chińskiej. Działanie farmakologiczne zmniejszające stężenie kwasu moczowego wynika z regulacji ekspresji genów kodujących transporter ABCG2, a w mniejszym stopniu OAT1, OAT3 i OCT2. ABCG2 jest transporterem nerkowym uczestniczącym w regulacji stężenia kwasu moczowego. Stwierdzono, że podawanie preparatu *Poria cocos* myszom z hiperurykemią ($526 \pm 112 \mu\text{mol/l}$) w dawce 50 mg na kilogram masy ciała, 100 mg na kilogram masy ciała oraz 200 mg na kilogram masy ciała powoduje obniżenie stężenia kwasu moczowego we krwi odpowiednio do wartości $178 \pm 53 \mu\text{mol/l}$, $153 \pm 57 \mu\text{mol/l}$ i $151 \pm 62 \mu\text{mol/l}$

w przypadku etanolowego ekstraktu oraz 69 ± 23 $\mu\text{mol/l}$, 63 ± 15 $\mu\text{mol/l}$ i 62 ± 20 $\mu\text{mol/l}$ w przypadku wodnego ekstraktu. Co ciekawe, końcowe stężenie kwasu moczowego we krwi myszy otrzymujących *Poria cocos* było niższe niż w przypadku zwierząt, które otrzymywały allopurynol (296 ± 96 $\mu\text{mol/l}$) oraz benzbromaron (258 ± 65 $\mu\text{mol/l}$) [24].

3.5. Astaksantyna

Astaksantyna jest karotenoidem ksantofilowym, który pochodzi głównie z organizmów morskich, a jego skuteczność potwierdzono w terapii hiperurykემii indukowanej wysoką dawką fruktozy. W badaniach przeprowadzonych na szczurach wykazano, że astaksantyna zmniejsza aktywność enzymatyczną oksydazy ksantynowej i deaminazy adenozynowej w surowicy i wątrobie poprzez obniżenie ich ekspresji, zmniejsza ekspresję białek reabsorbujących kwas moczowy URAT1 i GLUT9, a także podwyższa ekspresję białek sprzyjających wydalaniu kwasu moczowego, takich jak OAT1, OAT3 i ABCG2 [25].

3.6. Nobiletyna

Nobiletyna jest naturalnym związkami pozyskiwanym z roślin cytrusowych o właściwościach przeciwzapalnych i antyoksydacyjnych. Nobiletyna jest inhibitorem URAT1, a zatem może służyć jako składnik żywności o działaniu sprzyjającym obniżaniu stężenia kwasu moczowego we krwi. Nobiletyna ma jednak niską biodostępność po podaniu doustnym. W celu zwiększenia potencjału terapeutycznego nobiletyny opracowano postać farmaceutyczną tej substancji z wykorzystaniem metody ASD (ang. *amorphous solid dispersion*). Taka modyfikacja postaci farmaceutycznej nobiletyny (ASD/NOB), pozwoliła na poprawę właściwości farmakokinetycznych nobiletyny oraz efektywności jej działania hipourykemizującego. Wyniki po zastosowaniu ASD/NOB wykazały u szczurów wyższą ekspozycję ogólnoustrojową na nobiletynę z osiemnastokrotnym zwiększeniem biodostępności po podaniu doustnym. Stężenie kwasu moczowego uległo obniżeniu o 16% w porównaniu z nobiletyną bez modyfikacji [26].

3.7. Urolityna A

Urolityna A to metabolit wytwarzany przez bakterie jelitowe z polifenoli obecnych w owocach, takich jak granat i jagody, a także metabolit kwasu elagowego w jelitach. Adachi i wsp. przedstawili wyniki badań, w których udowodnili, że urolityna A hamuje aktywność oksydazy ksantynowej (badanie na hodowli komórkowej), zaś na mysim modelu hiperurykემii wykazano, że urolityna A powoduje obniżenie stężenia kwasu moczowego we krwi [27].

3.8. Genetycznie modyfikowane bakterie zawierające gen urykazy

W normalnych warunkach, mikroorganizmy w jelicie przekształcają część kwasu moczowego w alantoinę. W badaniu przeprowadzonym przez Cai i wsp. za pomocą technologii rekombinacji genów skonstruowano genetycznie modyfikowane bakterie wykazujące ekspresję urykazy. Geny zostały wprowadzone do genomu bakterii *Escherichia coli*. Skuteczność zaprojektowanych bakterii zweryfikowano w szczurzym modelu hiperurykემii. Zawartość jelit u zwierząt badano przez techniki sekwencjonowania DNA. Wszystkie szczury po wprowadzeniu dożołądkowo bakterii genetycznie modyfikowanych wykazywały ekspresję aktywnej urykazy bez konieczności jej indukcji. Nowe podejście do leczenia hiperurykემii poprzez degradację kwasu moczowego

przez urykazę syntetyzowaną przez mikroorganizmy jelitowe nie tylko zapobiega wchłanianiu jelitowego kwasu moczowego do krwiobiegu, ale także przyspiesza transport kwasu moczowego do jelita [28].

3.9. Hydrożel do wstrzykiwania zawierający koniugat albumina-urykaza

Hydrożele to trójwymiarowe sieci polimerowe, które pozwalają na kontrolowane uwalnianie białek terapeutycznych. Ze względu na wysoką zawartość wody, biokompatybilność i biodegradowalność znalazły zastosowanie jako nośniki środków terapeutycznych. Wyniki badania przeprowadzonego przez Cho i wsp. pokazały, że para złożona z albuminy surowicy ludzkiej i peptydu wiążącego albuminę, wprowadzona do białka terapeutycznego (w tym przypadku oksydaza moczanowa) i hydrożeli PEG-PAEU (kopolimer poli-glikol etylenowy – poli-β-aminoester uretanu, ang. *poly(ethylene glycol) and poly(β-amino ester urethane)*) może być stosowana do utrzymania nie tylko stężenia białka terapeutycznego, ale także skuteczności terapeutycznej *in vivo* [29].

3.10. *Lynophora pinaster*

Lynophora pinaster jest ziołem leczniczym nazywanym też „arniką brazylijską”, powszechnie znanym w medycynie ludowej. Dla oceny hipourykemizującego działania ekstraktu, zaprojektowano eksperymentalny model hiperurykემii wywołanej oksonianem potasu (inhibitor urykazy) u myszy. Wszystkie oceniane składniki *Lynophora pinaster* (kwas kawowy, chlorogenowy, E-lichnoforowy i cynamonowy, rutyna, kwercetyna, witeksyna, lupeol, stigmasterol) wykazywały działanie obniżające stężenie kwasu moczowego, ponieważ hamowały aktywność oksydazy ksantynowej w obrębie wątroby. Wykazano, że wpływ ekstraktu etanolowego *Lynophora pinaster* na stężenie kwasu moczowego we krwi jest podobny do efektu uzyskanego w wyniku stosowania allopuryngolu [30].

3.11. Bajkaleina

Bajkaleina została wyizolowana z korzeni *Labiatae* i została przebadana pod kątem efektu urykozurycznego na mysim modelu. Bajkaleina (w dawce 200 mg na kilogram masy ciała) wyraźnie zmniejsza ekspresję genów kodujących zarówno GLUT9, jak i URAT1. Do tej pory nie zgłoszono podwójnych inhibitorów GLUT9 i URAT1 pochodzących z naturalnych roślin, dlatego działanie bajkaleiny pokazuje interesującą perspektywę terapii hiperurykემii. W badaniu na myszach z hiperurykemią wykazano, że w zależności od dawki bajkaleina zmniejsza stężenie kwasu moczowego w surowicy i zwiększa wydalanie moczanów przez nerki [31].

3.12. Kurkumina

Kurkumina to naturalny hydrofobowy polifenol z kłączy *Curcuma longa*. Wykazano, że ma właściwości przeciwzapalne i przeciwutleniające, a także hamuje stan zapalny stawów wywołany moczanem jednosodowym. W badaniu na modelu hiperurykემii u myszy wywołanej oksonianem potasu dowiedziono, że leczenie kurkumina może znacząco hamować aktywność oksydazy ksantynowej w surowicy i wątrobie, a tym samym zmniejszać stężenie kwasu moczowego. Ponadto kurkumina hamuje aktywację inflamasomu NLRP3 (ang. *NLR family pyrin domain containing 3*) [32].



3.13. *Eucommia ulmoides*

Eucommia ulmoides jest stosowana w krajach azjatyckich jako tonik. Główne składniki, które prowadzą do zmniejszenia stężenia kwasu moczowego we krwi to kwas chlorogenowy, rutyna i kwercetyna. Fang i wsp. przedstawili wyniki badania przeprowadzonego na sześćdziesięciu myszach i sześćdziesięciu szczurach. Udowodniono, że *Eucommia ulmoides* wykazuje działanie wzmagające wydalanie kwasu moczowego i hamujące jego wchłanianie zwrotne w kanalikach nerkowych. Zwierzęta laboratoryjne włączone do grupy badawczej otrzymywały alkoholowy ekstrakt z kory *Eucommia ulmoides* w dawce małej, średniej lub dużej. Stwierdzono, że stosowanie preparatu wiąże się z istotnym zmniejszeniem stężenia kwasu moczowego we krwi, ze wzrostem ekspresji OAT1 i OAT3 oraz z obniżeniem ekspresji transporterów URAT1 i GLUT9 [33].

3.14. Nowe 2-podstawione kwasy 6-oksy-1,6-dihydropirymidyno-5-karboksyłowe

Nowe 2-podstawione kwasy 6-oksy-1,6-dihydropirymidyno-5-karboksyłowe są zaprojektowanymi i zsyntetyzowanymi analogami febuksostatu, inhibitorami oksydazy ksantynowej. Zhai i wsp. przeprowadzili badanie *in silico*, w którym przanalizowali strukturę czterdziestu sześciu takich substancji, co umożliwiło identyfikację właściwości strukturalnych tych związków, najważniejszych dla interakcji z centrum aktywnym oksydazy ksantynowej. Takie badania mogą przyczynić się do opracowania leku o korzystnych właściwościach dla skutecznego i bezpiecznego leczenia hiperurykემii [34].

4. Podsumowanie

Jak przedstawiono w niniejszej pracy, poszukiwanie nowych możliwości terapii hiperurykემii cieszy się dużym zainteresowaniem. Przedstawione potencjalne możliwości terapeutyczne znajdują się na różnych etapach badań naukowych, począwszy od badań *in silico* oraz *in vitro*, aż do dalszych faz badań klinicznych. Obecnie najbardziej zaawansowane badania dotyczą nowych substancji o działaniu urykozurycznym, takich jak dotinurad i werinurad.

Hiperurykemia odgrywa rolę w patogenezie wielu chorób, zaś częstość jej występowania wzrasta, co czyni ją ważnym problemem medycznym. Chociaż istnieją aktualnie trzy grupy leków stosowane w leczeniu hiperurykემii (inhibitory oksydazy ksantynowej, leki urykozuryczne, leki urykolityczne), konieczne jest poszukiwanie nowych możliwości terapeutycznych, które przyczynią się do poprawy skuteczności i bezpieczeństwa leczenia hiperurykემii.

Literatura

1. Stack A.G., Han D., Goldwater R., Johansson S., Dronamraju N., Oscarsson J., Johnsson E., Parkinson J., Erlandsson F., *Dapagliflozin added to verinurad plus febuxostat further reduces serum uric acid in hyperuricemia: The QUARTZ Study*, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 106(5), 2021, s. 2347-2356.
2. Stolarek W., Stolarek D., *Hiperurykemia w chorobach układu sercowo-naczyniowego*, Forum Medycyny Rodzinnej, 13(3), 2019, s. 116-124.
3. Borghi C., Tykarski A., Widecka K., Filipiak K. J., Domienik-Karłowicz J., Kostka-Jeziorny K., Varga A., Jaguszewski M., Narkiewicz K., Mancia G., *Expert consensus for*



- the diagnosis and treatment of patient with hyperuricemia and high cardiovascular risk*, *Cardiology Journal*, 25(5), 2018, s. 545-563.
4. Zhu Y., Pandya B. J., Choi H. K., *Comorbidities of gout and hyperuricemia in the US general population: NHANES 2007-2008*, *The American Journal of Medicine*, 125(7), 2012, s. 679-687.
 5. Oda M., Satta Y., Takenaka O., Takahata N., *Loss of urate oxidase activity in hominoids and its evolutionary implications*, *Molecular Biology and Evolution*, 19(5), 2002, s. 640-653.
 6. Enomoto A., Kimura H., Chairoungdua A., Shigeta Y., Jutabha P., Cha SH., Hosoyamada M., Takeda M., Sekine T., Igarashi T., Matsuo H., Kikuchi Y., Oda T., Ichida K., Hosoya T., Shimokata K., Niwa T., Kanai Y., Endou H., *Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels*, *Nature*, 417(6887), 2002, s. 447-452.
 7. Leander J., Sunnåker M., Rekić D., Aksenow S., Erikssona U.G., Johansson S., Parkinson J., *A semi-mechanistic exposure–response model to assess the effects of verinurad, a potent URAT1 inhibitor, on serum and urine uric acid in patients with hyperuricemia-associated diseases*, *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* 48, 2021, s. 525-541.
 8. Jakubiak G., *Zasady leczenia farmakologicznego dny moczanowej*, *Lek w Polsce*, 26, 5, 2016, s. 6-13.
 9. Hosoya T., Furuno K., Kanda S., *A clinical pharmacology study of the novel, selective urate reabsorption inhibitor dotinurad in outpatients*, *Clinical and Experimental Nephrology* 24, 2020, s. 103-111.
 10. Kuriyama S., *Dotinurad: A novel selective urate reabsorption inhibitor as a future therapeutic option for hyperuricemia*, *Clinical and Experimental Nephrology* 24, 2020, s. 1-5.
 11. Kubota M., *Hyperuricemia in children and adolescents: present knowledge and future directions*, *Journal of nutrition and metabolism*, 2019, 3480718.
 12. Jakubiak G.K., Grzybowski S., *Rola kwasu moczowego w fizjologii i patologii*, *Gabinet Prywatny*, 24(2), 2017, s. 48-55.
 13. Wilcox W.D., *Abnormal serum uric acid levels in children*, *The Journal of pediatrics*, 128(6), 1996, s. 731-741.
 14. Hosoya T., Sano T., Sasaki T., Fushimi M., Ohashi T., *Clinical efficacy and safety of dotinurad, a novel selective urate reabsorption inhibitor, in Japanese hyperuricemic patients with or without gout: randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, confirmatory phase 2 study*, *Clinical and Experimental Nephrology* 24, 2020, s. 53-61.
 15. Hosoya T., Furuno K., Kanda S., *A non-inferiority study of the novel selective urate reabsorption inhibitor dotinurad versus febuxostat in hyperuricemic patients with or without gout*, *Clinical and Experimental Nephrology* 24, 2020, s. 71-79.
 16. Hosoya T., Fushimi M., Okui D., Sasaki T., Ohashi T., *Open-label study of long-term administration of dotinurad in Japanese hyperuricemic patients with or without gout*, *Clinical and Experimental Nephrology* 24, 2020, s. 80-91.
 17. Park Y., Kim D., Lee J., Jeong H., Lee K., Kang T., *A 12-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial for evaluation of the efficacy and safety of DKB114 on reduction of uric acid in serum*, *Nutrients*, 12(12), 2020, s. 3794.
 18. Oshima S., Shiiya S., Nakamura Y., *Serum uric acid-lowering effects of combined glycine and tryptophan treatments in subjects with mild hyperuricemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study*, *Nutrients*, 11(3), 2019, s. 564.
 19. Pingali U., Nutalapati C., Koilagundla N., Taduri G., *A randomized, double-blind, positive-controlled, prospective, dose-response clinical study to evaluate the efficacy and tolerability of an aqueous extract of Terminalia bellerica in lowering uric acid and creatinine levels in chronic kidney disease subjects with hyperuricemia*, *BMC Complementary Medicine and Therapies* 20, 2020, s. 281.



20. López-Lázaro M., *Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin*, Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 9(1), 2009, s. 31-59.
21. An M.F., Wang M., Shen C., Sun Z., Zhao Y., Wang X., Sheng J., *Isoorientin exerts a urate-lowering effect through inhibition of xanthine oxidase and regulation of the tlr4-nlrp3 inflammasome signaling pathway*, Journal of Natural Medicines, 75(1), 2021, s. 129-141.
22. Niu Y., Yang P., Li H., Li Q., Lin H., Gao L., Li L., *Olsalazine sodium increases renal urate excretion by modulating urate transporters in hyperuricemic animals*, Biological And Pharmaceutical Bulletin, 43(11), 2020, s. 1653-1659.
23. Najjari A., Shahbazmohammadi H., Omidinia E., Movafagh A., *The effective control of hyperuricemia in cancer patients: a new recombinant conjugated variant of urate oxidase*, Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention, 22(2), 2021, s. 627-632.
24. Liang D., Yongn T., Diao X., Chen S., Chen D., Xiao C., Zuo D., Xie Y., Zhou X., Hu H., *Hypouricemic and nephroprotective effects of Poria cocos in hyperuricaemic mice by up-regulating ATP-binding super-family G member 2*, Pharmaceutical Biology, 59(1), 2021, s. 275-286.
25. Le Y., Zhou X., Zheng J., Yu F., Tang Y., Yang Z., Ding G., Chen Y., *Anti-hyperuricemic effects of astaxanthin by regulating xanthine oxidase, adenosine deaminase and urate transporters in rats*, Marine Drugs, 18(12), 2020, s. 610.
26. Nihei T., Ushiro E., Sato H., Onoue S., *Biopharmaceutical study on nobiletin-loaded amorphous solid dispersion with improved hypouricemic effect*, Molecules, 26(15), 2021, 4447.
27. Adachi S.I., Sasaki K., Kondo S., Komatsu W., Yoshizawa F., Isoda H., Yagasaki K., *Antihyperuricemic effect of urolithin a in cultured hepatocytes and model mice*, Molecules, 25(21), 2020, s. 5136.
28. Cai L., Li Q., Deng Y., Liu X., Du W., Jiang X., *Construction and expression of recombinant uricase-expressing genetically engineered bacteria and its application in rat model of hyperuricemia*, International Journal of Molecular Medicine, 45, 2020, s. 1488-1500.
29. Cho J., Kim S.H., Yang B., Jung J.M., Kwon I., Lee D.S., *Albumin affibody-outfitted injectable gel enabling extended release of urate oxidase-albumin conjugates for hyperuricemia treatment*, Journal of Controlled Release, 324, 2020, s. 532-544.
30. Müller C.M.D.S., Coelho G.B., Araújo M.C.D.P.M., Saúde-Guimarães D.A., *Lychnophora pinaster ethanolic extract and its chemical constituents ameliorate hyperuricemia and related inflammation*, Journal of Ethnopharmacology, 242, 2019, 112040.
31. Chen Y., Zhao Z., Li Y., Yang Y., Li L., Jiang Y., Lin C., Cao Y., Zhou P., Tian Y., Wu T., Pang J., *Baicalein alleviates hyperuricemia by promoting uric acid excretion and inhibiting xanthine oxidase*, Phytomedicine, 80, 2021, 153374.
32. Chen Y., Li C., Duan S., Yuan X., Liang J., Hou S., *Curcumin attenuates potassium oxonate-induced hyperuricemia and kidney inflammation in mice*, Biomedicine & Pharmacotherapy, 118, 2019, 109195.
33. Fang C., Chen L., He M., Luo Y., Zhou M., Zhang N., Yuan J., Wang H., Xie Y., *Molecular mechanistic insights into the antihyperuricemic effects of Eucommia ulmoides in mice and rats*, Pharmaceutical Biology, 57(1), 2019, s. 112-119.
34. Zhai N., Wang C., Wu F., Xiong L., Luo X., Ju X., Liu G., *Exploration of novel xanthine oxidase inhibitors based on 1,6-dihydropyrimidine-5-carboxylic acids by an integrated in silico study*, International Journal of Molecular Sciences, 22(15), 2021, 8122.

Kierunki rozwoju farmakoterapii hiperurykemii

Streszczenie

Hiperurykemia jest nieprawidłowym stanem metabolicznym charakteryzującym się podwyższonym stężeniem kwasu moczowego we krwi. Hiperurykemia zwiększa ryzyko rozwoju chorób, takich jak dna moczniowa, kamica nerkowa, czy też choroby układu sercowo-naczyniowego. Aktualnie w praktyce klinicznej znajdują zastosowanie trzy grupy leków obniżających stężenie kwasu moczowego we krwi (inhibitory

oksydazy ksantynowej, leki urykozuryczne oraz leki urykolityczne). Mimo tego, konieczne są prace nad nowymi lekami, które poprawią skuteczność i bezpieczeństwo leczenia hiperurykemii. Celem niniejszej pracy było przeprowadzenie przeglądu literatury na temat wyników aktualnych badań w zakresie nowych kierunków rozwoju farmakoterapii hiperurykemii, zarówno na etapie badań klinicznych, jak również przedklinicznych. Spośród opisanych substancji, na najwyższym poziomie zaawansowania są prace nad werinuradem i dotinuradem (leki urykozuryczne). Właściwości hipourykemizujące mają również preparaty pochodzenia naturalnego oraz suplementy diety, takie jak m.in. DKB114, bajkaleina, kurkumina, ekstrakt z *Terminalia bellerica*, *Poria cocos*, *Eucommia ulmoides*, czy skojarzenie aminokwasów glicyny i tryptofanu. Do interesujących kierunków badań należą także prace nad żelem iniekcyjnym zawierającym koniugat albumina-urykazy, czy też wykorzystanie genetycznie modyfikowanych bakterii zawierających rekombinowany gen urykazy.

Słowa kluczowe: kwas moczowy, hiperurykemia, inhibitory oksydazy ksantynowej, leki urykozuryczne, leki urykolityczne

Directions for the development of pharmacotherapy of hyperuricemia

Abstract

Hyperuricemia is an abnormal metabolic condition characterised by elevated blood uric acid levels. Hyperuricemia increases the risk of developing diseases such as gout, kidney stones, and cardiovascular disease. Currently, three groups of drugs lowering blood uric acid concentrations (xanthine oxidase inhibitors, uricosuric drugs and uricolytic drugs) are used in clinical practice. Nevertheless, work is needed on new drugs to improve the efficacy and safety of treatment of hyperuricaemia. The aim of the present paper was to conduct a literature review on the results of current research on new directions in the development of pharmacotherapy of hyperuricaemia, both at the clinical and preclinical stages. Of the substances described, work on verinurad and dotinurad (uricosuric drugs) is at the highest level. Preparations of natural origin and dietary supplements such as DKB114, baicalein, curcumin, extract from *Terminalia bellerica*, *Poria cocos*, *Eucommia ulmoides* or association of amino acids glycine and tryptophan have also hypouricemic properties. Other interesting research directions include the development of an injectable gel containing an albumin-uricase conjugate or the use of genetically modified bacteria containing a recombinant uricase gene.

Keywords: uric acid, hyperuricemia, xanthine oxidase inhibitors, uricosuric drugs, uricolytic drugs



Rola cytokin w rozwoju i przebiegu dystrofii śródbłonka rogówki

1. Wprowadzenie

Dystrofie rogówki to powszechnie używany termin, służący do opisu dziedzicznych chorób rogówki nie mających związku z czynnikami środowiskowymi lub/i systemowymi. Obserwowany w ostatnich latach dynamiczny rozwój nauki okulistyki (nowoczesna aparatura, nowe techniki badawcze, odkrycie nowych parametrów biochemicznych), przyczynił się do lepszego poznania tej grupy chorób i ujawnił m.in. brak dziedziczności w rozwoju dystrofii błony podstawnej nabłonka. Poznanie mechanizmów zaangażowanych w rozwój choroby daje nadzieję na wcześniejszą diagnozę oraz włączenie leczenia zachowawczego w miejsce zabiegów chirurgicznych. Grupą białek zaangażowanych w rozwój i przebieg większości zakażeń i chorób są cytokiny. Wydaje się oczywiste, że wiele spośród tych białek może odgrywać istotną rolę w powstawaniu, progresji i różnicowaniu tych chorób. Równocześnie, trudność w pozyskiwaniu płynów biologicznych dobrze odzwierciedlających procesy fizjologiczne i patologiczne toczące się w obrębie oka, jest powodem ciągłego poszukiwania odpowiedniego materiału biologicznego. Badania ostatnich lat wskazują na ciecz wodnistą jako potencjalnie dobry materiał biologiczny, mogący służyć do przeprowadzania oznaczeń biochemicznych.

Celem niniejszej publikacji jest przedstawienie najnowszej wiedzy na temat udziału cytokin w rozwoju i przebiegu chorób z grupy dystrofii śródbłonka rogówki z wykorzystaniem cieczy wodnistej jako materiału diagnostycznego.

2. Dystrofie rogówki

Dystrofie rogówki to termin powszechnie używany do opisu grup dziedzicznych chorób rogówki, które są typowo obustronne, symetryczne, wolno postępujące i nie mają związku z czynnikami środowiskowymi lub systemowymi. Wraz z coraz lepszym poznaniem tej grupy chorób pojawiły się jednak wyjątki od tej definicji. U większości pacjentów z dystrofią błony podstawnej nabłonka (*epithelial basement membrane dystrophy*, EBMD), nie wykazano dziedzicznych cech choroby. Przykładowo, niektórzy pacjenci z dystrofią polimorficzną tylną rogówki (*posterior polymorphous corneal dystrophy*, PPCD) manifestują objawy niesymetrycznie. Również w dystrofii plamkowej rogówki (*macular corneal dystrophy*, MCD) poziom antygenowego siarczanu keratanu w surowicy koreluje z immunofenotypami choroby, co może wskazywać na

¹ fiolkarafal@gmail.com, Katedra i Oddział Kliniczny Okulistyki, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

² dominikacholewa1@gmail.com, Katedra i Oddział Kliniczny Okulistyki, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

³ gospodarczyk.alicja@gmail.com, Katedra i Zakład Biochemii, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

⁴ ewylegala@sum.edu.pl, Katedra i Oddział Kliniczny Okulistyki, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

systemowe zaburzenia, będące integralną częścią rozwoju charakterystycznych zmian na rogówce. Ponadto, należy wspomnieć, że istnieją choroby dziedziczne, symetryczne rogówki, które nie są klasyfikowane jako dystrofie rogówki. Zalicza się do nich rogówkę płaską, która nie jest klasyfikowana jako dystrofia rogówki a może być alternatywnie umieszczona wśród dziedzicznych chorób wpływających na rogówkę.

Dystrofie zaczynają rozwijać się na wczesnym etapie życia i postępują powoli. Objawy narastają z wiekiem, stąd istotne pod względem klinicznym stają się najczęściej dopiero po wielu latach trwania choroby. Charakteryzują się często progresywnym odkładaniem depozytów, które z kolei mogą być wynikiem mutacji genetycznych prowadzących do produkcji patologicznych białek. Mutacje w genie kodującym białko indukowane transformującym czynnikiem wzrostu beta (*transforming growth factor beta-induced gene*, TGFBI), prowadzą do produkcji białka keratopiteliny. Doniesienia naukowe wskazują, że wielu pacjentów z dystrofiami rogówki powiązanych z odkładaniem depozytów zgłasza objawy takie jak, zaburzenia ostrości widzenia, nieregularny astygmatyzm, nawracające erozje rogówki albo nieprzezierność istoty właściwej. Objawy te mogą już występować, gdy zmiany patologiczne są raczej powierzchowne i obejmują kompleks błony podstawnej nabłonka. Należy jednak zauważyć, że obrzęk rogówki również może wpływać na ostrość widzenia (np. w dystrofii rogówki Fuchsa), jak również wpływ na rozwój choroby mogą mieć dystrofie niezwiązane z odkładaniem depozytów (np. EBMD) [1].

Ze względu na trudności w dokładnym zdefiniowaniu dystrofii rogówki, International Committee for Classification of Corneal Dystrophies (IC3D) sklasyfikował dystrofie rogówki w czterech grupach: dystrofie nabłonka i podnabłonkowe (*epithelial and sub-epithelial dystrophies*), dystrofie nabłonkowo-mięsiste związane z TGFBI (*epithelial-stromal TGFBI dystrophies*), dystrofie istoty właściwej (*stromal dystrophies*) oraz dystrofie śródbłonka (*endothelial dystrophies*, ED) [2].

Dystrofie śródbłonka rogówki, do których zalicza się dystrofię Fuchsa, są jedyną grupą spośród grup wyróżnionych w Klasyfikacji Dystrofii Rogówki IC3D, w których wykonuje się oznaczenia stężeń cytokin w cieczy wodnistej. W przypadku dystrofii Fuchsa jest to spowodowane brakiem dziedziczenia tego schorzenia. Objawy dystrofii są obustronne, wolno postępujące i dotyczą komórek śródbłonka rogówki (większość przypadków chorobowych odkrywanych jest dopiero w czwartej dekadzie życia bądź też później). Choroba charakteryzuje się degeneracją komórek śródbłonka, rozwojem cornea guttata, czyli formowaniem się depozytów macierzy pozakomórkowej błony Descemeta. Wynikiem tych zmian jest obrzęk istoty właściwej, powstawanie pęcherzy śród- i podnabłonkowych (keratopatia pęcherzowa), oraz włóknienie podnabłonkowe z powierzchniową waskularyzacją. W chwili obecnej brak jest procedur leczenia przy czynowego tej choroby. Jedyną możliwością to leczenie chirurgiczne w postaci przeszczepu warstwowego tylnego lub przeszczepu drążącego rogówki [3, 4].

Drugą dystrofią należącą do tej samej grupy, jest dystrofia polimorficzna tylna rogówki. Jest ona dziedziczona autosomalnie dominująco. Należy jednak zauważyć, że zaobserwowano wyizolowane przypadki z podobnym fenotypem, jednak bez cech dziedziczenia. Zmiany w rogówkach obserwowane są obustronnie, jednak często obserwuje się także niesymetryczność zmian. Choroba charakteryzuje się rozlanymi nieprawidłowościami w błonie Descemeta. W badaniu w lampie szczelinowej można zaobserwować wielowarstwowość komórek śródbłonka, izolowane skupiska pęcherzyków

śródbłonka, szare zmiany o kształcie geograficznym oraz pasma śródbłonka o brzegach w kształcie muszli. W badaniu mikroskopii konfokalnej zaobserwować można pęcherzykowate zmiany oraz obraz „torów kolei żelaznej”, czyli ciemne obszary w postaci pasm o nieregularnych brzegach. Obecne mogą być również obrzęki rogówki. W przypadku tej dystrofii dostępne jest leczenie objawowe, z uwagi na to, że po zabiegu przeszczepu rogówki obserwowano często nawrót objawów chorobowych [5].

1. Ciecz wodnista jako materiał diagnostyczny

Ciecz wodnista to przezroczysty płyn znajdujący się w komorze przedniej oka. Jest on produkowany przez ciało rzęskowe i przepływa z komory tylnej gałki ocznej, dookoła soczewki i przez tęczęwkę do komory przedniej. Opuszcza oko do układu żylnego poprzez siateczkę beleczkową, przez kanał Schlemma oraz przez drogę naczyniówkowo-twardówkową (*uveoscleral pathway*). W ponad 80-ciu procentach ciecz wodnista jest produkowana w mechanizmie aktywnej sekrecji, a produkcja i uwalnianie do komory tylnej jest wynikiem tego wydzielania oraz następującej po tym ultrafiltracji i dyfuzji [6,7].

Ciecz wodnista jest zaliczana do płynów fizjologicznych, wykorzystywanych w badaniach naukowych dotyczących różnych jednostek chorobowych. W badaniach z jej wykorzystaniem ocenia się zarówno charakterystykę zachowania samej cieczy wodnistej, jak również wykonuje się oznaczenia biochemiczne celem zbadania jej składu. Oznaczane jest w niej wiele parametrów biochemicznych, w tym stężenie cytokin, o czym świadczą aktualne prace przeglądowe. Hubens W.H.G. i wsp. dokonali przeglądu prac związanych ze stężeniem białek w cieczy wodnistej u pacjentów z jaskrą pierwotną otwartego kąta. W swojej pracy uwzględnili 93 publikacje skupiające się na tym aspekcie [8]. W innej pracy, Ghiam B.K. i wsp. dokonali przeglądu piśmiennictwa celem oceny biomarkerów retinoblastomy, najczęstszego wewnątrzgałkowego nowotworu złośliwego u dzieci, również z wykorzystaniem cieczy wodnistej [9].

Interesujące wyniki w zakresie ekspresji cytokin w cieczy wodnistej u pacjentów z wysoką krótkowzrocznością i zaćmą otrzymali Zhang J.S. i wsp. Autorzy włączyli do badań 68 pacjentów, u których zbadali ekspresję 440 ludzkich cytokin w cieczy wodnistej. Grupę kontrolną stanowili pacjenci z zaćmą, lecz bez wysokiej krótkowzroczności. W badaniach wykazano istotne statystycznie różnice w ekspresji dla Decorin, RANK, GTR, GTR, PDGF Rb, ANG-1, IL-9, CXCL16, bIG-H3, IGFBP-2, IL-17B i MMP-2 w grupie badanej względem grupy kontrolnej. Badanie potwierdziło także, że ekspresja dla MMP-2 w cieczy wodnistej pacjentów z wysoką krótkowzrocznością jest istotnie wyższa, niż w grupie kontrolnej. Wykazano również, że wzrost stężenia ANG-1 w cieczy wodnistej u pacjentów z wysoką krótkowzrocznością z zaćmą może być związany z patogenezą wysokiej krótkowzroczności [10].

W innej pracy, prowadzonej z udziałem pacjentów z idiopatycznym otworem w plamce (*idiopathic macular hole*), Wang H. i wsp. oznaczyli stężenia 48 cytokin w cieczy wodnistej w grupie 38 pacjentów. Autorzy wykazali istotnie statystyczną różnicę w stężeniach cytokin pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną, którą stanowili pacjenci z zaćmą. Stężenie HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), GM-CSF, INF- γ było znacząco podwyższone a stężenie TNF- α , GRO- α oraz MIF było znacząco obniżone w stosunku do grupy kontrolnej. Wykazano również pozytywną korelację stężenia GM-CSF do stężeń IL-1, IL-4 oraz INF- γ . Stężenia NGF (*Nerve Growth Factor*) oraz

HGF wykazały znaczącą pozytywną korelację w badanej grupie. Pacjenci z idiopatycznym otworem w plamce wykazywali znaczną zmienność reakcji odpornościowej w cieczy wodnistej, w tym rekrutacji komórek odpornościowych i regulacji ekspresji cytokin. Autorzy zasugerowali także pominięcie pacjentów z idiopatycznym otworem w plamce jako grupę kontrolną w badaniach poziomu cytokin w cieczy wodnistej [11].

2. Cytokiny

Cytokiny to grupa cząstek sygnałowych produkowanych/uwalnianych przez limfocyty, leukocyty, makrofagi oraz komórki śródbłonka naczyń i komórki NK (*Natural Killer*) w celu regulacji i wpływu na odpowiedź immunologiczną. Pod względem budowy są to drobnocząsteczkowe białka sekrecyjne, odgrywające istotną rolę w procesach zapalnych oraz regulacji mechanizmów związanych z wrodzoną oraz adaptacyjną odpowiedzią immunologiczną organizmu. Uwalnianie prozapalnych cytokin prowadzi do aktywacji komórek odpornościowych i produkcji oraz uwalniania kolejnych cytokin, czyli rozpoczyna twz. „burzę cytokinową” („*cytokine storm*”). W przeszłości termin ten wyjaśniał stan zapalny jako nagłe uwolnienie cytokin w celu wywołania procesu zapalnego. Jednak ostatnie badania wskazują, że jednoczesowe uwalnianie cytokin pro- i przeciwzapalnych jest niezbędne w każdej odpowiedzi immunologicznej. Nomenklatura cytokin jest skomplikowana, nazywa się nimi na przykład interleukiny, chemokiny czy czynniki wzrostu. Cytokiny składają się z tak zwanych superfamilies, które niekoniecznie muszą posiadać wspólne geny, ale raczej podobne struktury. Ponadto, różne populacje komórek mogą produkować te same cytokiny. Efekt działania cytokin jest zależny od docelowej komórki, czyniąc je plejotropowymi. Różne cytokiny mogą również mieć taki sam efekt, bądź też wykazywać działanie synergistyczne. Mogą one potencjalnie uwolnić całą kaskadę sygnałów, dając najmniejszym ilościom białka szansę na dewastujący efekt [12-15].

Dotychczas poznano strukturę i funkcje ponad 200 cytokin, wśród których wyróżnia się limfokiny – regulujące działanie układu odpornościowego, cytokiny prozapalne – będące mediatorami procesów zapalnych (np. IL-1, IL-6, IL-8, czynnik martwicy nowotworów TNF-alfa, INF-gamma), czynniki wzrostu komórek – wpływające na przeżycie komórek (np. FGF, GM-CSF, czy G-CSF), chemokiny o działaniu chemotaktycznym w zapaleniu oraz cytokiny przeciwzapalne (np. IL-4, IL-10, IL-13, czy TGF-beta) [12-15].

3. Udział cytokin oznaczanych w cieczy wodnistej w przebiegu dystrofii śródbłonka

3.1. Dystrofia Fuchsa

Badania ostatnich kilku lat zaowocowały kilkoma obiecującymi publikacjami z zakresu udziału cytokin w przebiegu dystrofii Fuchsa, jednak wyniki tych badań są odmienne i niejednoznaczne. W pracy Fisenko i wsp., autorzy poddali ocenie stężenia cytokin w cieczy wodnistej pacjentów z dystrofią śródbłonka rogówki Fuchsa (FECD) i keratopatią pęcherzową (BK). Badaniem objęto 74 pacjentów, w tym 31 pacjentów z FECD i 35 z BK. Grupę kontrolną stanowiło 8 pacjentów z niedojrzałą zaćmą. Przed operacją pacjenci byli poddawani pachymetrii rogówki centralnej (RTvue-100 OCT, Optovue, USA). Pacjenci z grup FECD i BK przeszli keratoplastykę śródbłonka (*Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty*, DSAEK lub *Descemet*

Membrane Endothelial Keratoplasty, DMEK) lub przeszczep rogówki (*Penetrating Keratoplasty*, PK). Pacjenci z grupy kontrolnej byli poddawani fakoemulsyfikacji soczewki ze wszczepieniem sztucznej soczewki wewnątrzgałkowej. Przed zabiegami pobierano od pacjentów próbki cieczy wodnistej, do oceny stężeń cytokin. W badaniach, z użyciem metody fluorescencyjnej cytometrii przepływowej z wykorzystaniem zestawu Bio-Plex Pro Human Cytokine Panel, 17-plex (Bio-Rad, USA), oceniono stężenia IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN γ , MCP-1, MIP-1 β i TNF- α . Analiza multipleksowa nie wykazała statystycznie istotnych różnic w stężeniach cytokin pomiędzy oczami pacjentów z dekomensacją FECD i BK. Autorzy zaobserwowali jednak wyższe stężenia IL-6, IL-8, GM-CSF, IFN γ , MCP-1, MIP-1 β u pacjentów z dystrofią śródbłonka rogówki Fuchsa oraz keratopatią pęcherzową w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną. Autorzy zaobserwowali także nieistotne statystycznie różnice w stężeniach interleukin IL-4 i IL-13. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w stężeniach IL-1 β i TNF- α (jako parametrów ostrego stanu zapalnego) pomiędzy badanymi grupami [16].

Uzyskane dane dowodzą, że FECD i BK są związane z zaburzeniami przywileju immunologicznego oka, co prowadzi do chronicznego miejscowego stanu zapalnego, będącego powodem przemodelowania tkanek rogówki i finalnego jej zwłóknienia.

Celem kolejnych badań prowadzonych przez Matthaei i wsp., w których również wykorzystano ciecz wodnistą jako materiał diagnostyczny, była obserwacja ekspresji cytokin związanych z przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) u pacjentów z oczami fakijnymi i pseudofakijnymi z dystrofią śródbłonka rogówki Fuchsa (FECD) oraz korelacja uzyskanych wyników ze stopniem zaawansowania choroby. Grupy badane obejmowały oczy fakijne z FECD (FECDph, n = 9) oraz oczy pseudofakijne z FECD poddane badaniu minimum rok po przebytej operacji usunięcia zaćmy (FECDpsph, n = 13). Grupę kontrolną stanowiły oczy z zaćmą, bez FECD (Controlcat, n = 28). Ciecz wodnista pobierana była podczas zabiegu keratoplastyki błony Descemeta (DMEK) lub podczas fakoemulsyfikacji soczewki ze wszczepieniem sztucznej soczewki wewnątrzgałkowej, następnie natychmiast zamrożona w -80°C do czasu wykonania pomiaru ekspresji białek. Do pomiaru ekspresji cytokin związanych z EMT (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, MCP-1, BFGF, TNF- α , IL-1 β) użyto zestawu Luminex Performance Assay 3-plex kit (R&D Systems, Wiesbaden, Germany). Jako obiektywną miarę stopnia zaawansowania FECD przed operacją zastosowano stosunek grubości środkowej do obwodowej rogówki w odległości 3,5 mm od środka (*central-to-peripheral thickness ratio at 3.5 mm from the center*, CPTR3,5) wyznaczony za pomocą szczelinowo-skaningowej pachymetrii. W cieczy wodnistej oczu pseudofakijnych z FECD zaobserwowano istotnie statystycznie wyższą ekspresję TGF- β 1, TGF- β 2 i MCP-1 w porównaniu z oczami z grupy kontrolnej i oczami fakijnymi z FECD. Ponadto, wykazano dodatnią korelację TGF- β 1 i MCP-1 z CPTR3,5. Nie wykazano natomiast różnic w poziomach białka związanego z EMT porównując grupę oczu fakijnych z FECD do grupy kontrolnej [17].

Zaobserwowane wyższe stężenia TGF- β 1, TGF- β 2 i MCP-1 w oczach pseudofakijnych z FECD wskazują na to, że operacja usunięcia zaćmy prowadzi do długotrwałych zmian mikrośrodowiska wewnątrzgałkowego. Dodatnia korelacja stężeń TGF- β 1 i MCP-1 z CPTR3,5 w oczach pseudofakijnych z FECD może sugerować natomiast, że zmiana poziomu cytokin może być związana z dekomensacją rogówki po operacji

usunięcia zaćmy. Jednak nieistotne różnice w stężeniach białek związanych z EMT w cieczy wodnistej w oczach fakijnych z FECD wskazują na to, że rola tych cytokin w obrębie cieczy wodnistej nie wywiera istotnego wpływu na patogenezę FECD [17].

3.2. Dystrofia polimorficzna tylna rogówki

W zakresie badań dystrofii polimorficznej tylnej rogówki, w dostępnym mi piśmiennictwie odnalazłem jedną pracę. Andrea Stadnikowa i wsp. podjęli próbę oceny stężenia TGF- β 2 (*transforming growth factor-beta 2*) w cieczy wodnistej u pacjentów z dystrofią polimorficzną tylną rogówki (*posterior polymorphous corneal dystrophy*, PPCD). Celem realizacji założeń pracy, autorzy oznaczyli stężenie aktywnego TGF- β 2 w cieczy wodnistej 29 pacjentów z PPCD (42 próbki). Grupę kontrolną stanowiły 44 próbki pobrane od 40 nieboszczyków. Ze względu na molekularną genetyczną przyczynę choroby, pacjenci grupy badanej zostali podzieleni na poszczególne podgrupy: grupę u których powodem choroby jest mutacja promotora OVOL2 (PPCD1, 37 próbek), grupę z mutacją w genach ZEB1 (PPCD3, 1 próbka) i grupę bez połączenia ze znanym loci PPCD (PPCDx, 4 próbki). Dokonano także podziału ze względu na obecność (17 próbek) lub nieobecność (25 próbek) wtórnej jaskry. Ostatniego podziału dokonano ze względu na rodzaj przeprowadzonego zabiegu, na pacjentów poddanych przeszczepowi rogówki (PK, 32 próbki) oraz pacjentów poddanych wtórnym przeszczepom (rePK, 7 próbek). Ciecz wodnistą pobierano podczas wykonywania zabiegów PK, operacji usunięcia zaćmy lub zabiegów przeciwjaskrowych. Pobrany materiał biologiczny następnie zamrożono w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń. Stężenie oznaczono za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (SB250, Quantikine1, R&D Systems, UK). Pomiary zostały wykonane 2-4 krotnie dla każdej próbki (w ilość była uzależniona od uzyskanej objętości cieczy wodnistej). W pracy wykazano, że stężenie aktywnego TGF- β 2 u wszystkich pacjentów z PPCD było istotnie statystycznie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej. W grupach PPCD1 oraz PPCDx stężenie badanej cytokiny było najwyższe. Wykazano również, że na stężenie aktywnego TGF- β 2 u pacjentów z PPCD nie ma znaczącego wpływu płeć, wiek, wtórna jaskra, progresja dystrofii i wielokrotne PK [18]. Zaobserwowane wyniki mogą wskazywać na potencjalną rolę diagnostyczną TGF- β 2 w diagnozowaniu PPCD.

4. Podsumowanie

Obiecujące wyniki przeprowadzonych dotychczas badań, przy niewielkiej ich ilości wskazują, że obrany przeze mnie kierunek poszukiwań mechanizmów zaangażowanych w rozwój dystrofii śródbłonna rogówki Fuchsa jest właściwy. Spośród kilkudziesięciu oznaczanych cytokin o właściwościach pro- i przeciwzapalnych, z uwagi zaobserwowane zmiany ich stężeń w cieczy wodnistej pacjentów, na szczególną uwagę zasługują IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF, INF- γ , MCP-1, MIP-1, MIP-1 β oraz TGF- β 1 i TGF- β 2. Wydaje się, że białka te odgrywają istotną rolę w zarówno w patomechanizmie, jak i progresji dystrofii rogówki, jednak mechanizmy ich działania nie zostały dobrze poznane, stąd konieczność przeprowadzenia dalszych badań w tym zakresie.



Literatura

1. Weisenthal R.W., Daly M.K., de Feritas D., Feder R.S., Orlin S.E., Tu E.Y., Van Meter W.S., Verdier D.D., *Basic and Clinical Science Course, Section 8: External Disease and Cornea, American Academy of Ophthalmology*, 2019, s. 133-134.
2. Weiss J.S., Møller H.U., Aldave A.J., Seitz B., Bredrup C., Kivelä T., Munier F.L., Rapuano C.J., Nischal K.K., Kim E.K., Sutphin J., Busin M., Labbé A., Kenyon K.R., Kinoshita S., Lisch W., *IC3D classification of corneal dystrophies-edition 2*, *Cornea*, 34(2), 2015, s. 117-59. doi: 10.1097/ICO.0000000000000307 Erratum in: *Cornea*. 2015, 34(10), s. 32.
3. Micińska A., Nowińska A., Sendeci A., Wylęgała E., *Dystrofia śródbłonkowa Fuchsa – aktualne poglądy na patofizjologię i leczenie choroby*, *Ophthalmology*, 2020, 7/3 (27), 213-224. doi: 10.24292/01.OT.300920.3.
4. Moshirfar M., Somani A.N., Vaidyanathan U., Patel B.C., *Fuchs Endothelial Dystrophy*. 2021, in: StatPearls [Internet], Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022, PMID: 31424832.
5. Guier C.P., Patel B.C., Stokkermans T.J., Gulani A.C., *Posterior Polymorphous Corneal Dystrophy*, 2021, in: StatPearls [Internet], Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022, PMID: 28613630.
6. Dmurchowska D.A., Pietrowska K., Krasnicki P., Kowalczyk T., Misiura M., Grochowski E.T., Mariak Z., Kretowski A., Ciborowski M. *Metabolomics Reveals Differences in Aqueous Humor Composition in Patients with and Without Pseudoexfoliation Syndrome*, *Front Mol Biosci*. 2021, 14(8), 682600. doi: 10.3389/fmolb.2021.682600.
7. Costagliola C., dell'Omo R., Agnifili L., Bartollino S., Fea A.M., Uva M.G., Zeppa L., Mastropasqua L., *How many aqueous humor outflow pathways are there?*, *Surv Ophthalmol*. 2020, 65(2), s. 144-170, doi: 10.1016/j.survophthal.2019.10.002.
8. Hubens W.H.G., Mohren R.J.C., Liesenborghs I., Eijssen L.M.T., Ramdas W.D., Webers C.A.B., Gorgels T.G.M.F., *The aqueous humor proteome of primary open angle glaucoma: An extensive review*, *Exp Eye Res*. 2020, 197, 108077, doi: 10.1016/j.exer.2020.108077.
9. Ghiam B.K., Xu L., Berry J.L., *Aqueous Humor Markers in Retinoblastoma, a Review*. *Transl Vis Sci Technol.*, 2019, 9, 8(2), s. 13, doi: 10.1167/tvst.8.2.13.
10. Zhang J.S., Da Wang J., Zhu G.Y., Li J., Xiong Y., Yusufu M., He H.L., Sun X.L., Ju T., Tao Y., He S.Z., Wan X.H., *The expression of cytokines in aqueous humor of high myopic patients with cataracts*, *Mol Vis.*, 2020, 5, 26, s. 150-157.
11. Wang H., Li Y., Han S., Niu T., *Analysis of multiple cytokines in aqueous humor of patients with idiopathic macular hole*, *BMC Ophthalmol.*, 2021, 11, 21(1), s. 27, doi: 10.1186/s12886-020-01782-6.
12. Kany S., Vollrath J.T., Relja B., *Cytokines in Inflammatory Disease*, *Int J Mol Sci.*, 2019, 28, 20(23), 6008, doi: 10.3390/ijms20236008.
13. Velaazquez-Salinas L., Verdugo-Rodriguez A., Rodriguez L.L., Borca M.V., *The role of interleukin 6 during viral infections*, *Front. Microbiol.* 2019, doi.org/10.3389/fmicb.2019.01057.
14. Gulati K., Gahathakurta S., Joshi J., Rai N., Ray A., *Cytokines and their role in health and disease: A brief overview*, *MOJ Immunol.*, 2016, 4(2), 00121, doi: 10.15406/moji.2016.04.00121.
15. Gliński Z., Żmuda A., *Cytokiny i burza cytokinowa przyczyną zaburzeń wielonarządowych i śmieci*, *Życie weterynaryjne*, 2021, 96(7), s. 482-486.
16. Fisenko N.V., Trufanov S.V., Avetisov K.S., Vtorushina V.V., Subbot A.M., *Opredelenie urovnya tsitokinov vo vnutriglaznoi zhidkosti pri endotelial'noi distrofii rogovitsy Fuxsa i bulleznoi keratopatii [Evaluation of aqueous cytokine levels in eyes with Fuchs endothelial corneal dystrophy and bullous keratopathy]*, *Vestn Oftalmol.*, 2021, 137(3), s. 13-18, doi: 10.17116/oftalma202113703113.

17. Matthaei M., Gillissen J., Muether P.S., Hoerster R., Bachmann B.O., Hueber A., Cursiefen C., Heindl L.M., *Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)-Related Cytokines in the Aqueous Humor of Phakic and Pseudophakic Fuchs' Dystrophy Eyes*, Invest Ophthalmol Vis Sci., 2015, 56(4), 2749-54, doi: 10.1167/iovs.15-16395.
18. Stadnikova A., Dudakova L., Skalicka P., Valenta Z., Filipec M., Jirsova K., *Active transforming growth factor- β 2 in the aqueous humor of posterior polymorphous corneal dystrophy patients*, PLoS One, 2017, 17, 12(4), 0175509, doi: 10.1371/journal.pone.0175509.

Rola cytokin w rozwoju i przebiegu dystrofii śródbłonka rogówki

Streszczenie

Celem publikacji jest przedstawienie najnowszej wiedzy na temat udziału cytokin w rozwoju i przebiegu chorób z grupy dystrofii śródbłonka rogówki z wykorzystaniem cieczy wodnistej jako materiału diagnostycznego. Dystrofie rogówki to powszechnie używany termin, służący do opisu dziedzicznych chorób rogówki nie mających związku z czynnikami środowiskowymi i systemowymi. Obserwowany w ostatnich latach dynamiczny rozwój naukowy w zakresie okulistyki przyczynił się do lepszego poznania tej grupy chorób i ujawnił m.in. brak dziedzicznych cech w rozwoju dystrofii błony podstawnej nabłonka. Poznanie mechanizmów zaangażowanych w rozwój choroby daje nadzieję, na wcześniejszą diagnozę oraz włączenie leczenia zachowawczego w miejsce chirurgicznego. Grupą białek zaangażowanych w rozwój i przebieg większości zakażeń i chorób są cytokiny. Wydaje się oczywiste, że wiele spośród tych białek może odgrywać istotną rolę w powstawaniu, progresji i różnicowaniu tych chorób. Równocześnie, trudność w pozyskiwaniu płynów biologicznych dobrze odzwierciedlających procesy fizjologiczne i patologiczne toczące się w obrębie oka, jest powodem ciągłego poszukiwania odpowiedniego materiału biologicznego. Badania ostatnich lat wskazują na ciecz wodnistą jako potencjalnie dobry materiał, mogący służyć do przeprowadzania oznaczeń parametrów biochemicznych. Spośród kilkudziesięciu oznaczanych cytokin o właściwościach pro- i antyzapalnych, z uwagi zaobserwowane zmiany ich stężeń w cieczy wodnistej pacjentów, na szczególną uwagę zasługują IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF, INF- γ , MCP-1, MIP-1, MIP-1 β oraz TGF- β 1 i TGF- β 2. Wydaje się, że białka te odgrywają istotną rolę w zarówno w patomechanizmie, jak i progresji dystrofii rogówki, jednak mechanizmy ich działania nie zostały dobrze poznane, stąd konieczność przeprowadzenia dalszych badań w tym zakresie.

Słowa kluczowe: dystrofie rogówki, cytokiny, ciecz wodnista

The role of cytokines in the development and course of corneal endothelial dystrophy

Abstract

The aim of the publication is to present the latest knowledge on the role of cytokines in the development and course of diseases from the group of corneal endothelial dystrophy with the use of aqueous humor as diagnostic material. Corneal dystrophies are a commonly used term to describe inherited conditions of the cornea unrelated to environmental and systemic factors. The dynamic scientific development in the field of ophthalmology observed in recent years has contributed to a better understanding of this group of diseases and revealed, among others, no hereditary features in the development of epithelial basement membrane dystrophy. Understanding the mechanisms involved in the development of the disease gives hope for an earlier diagnosis and the introduction of conservative treatment instead of surgery. Cytokines are the group of proteins involved in the development and course of most infections and diseases. It seems obvious that many of these proteins may play an important role in the development, progression and differentiation of these diseases. At the same time, the difficulty in obtaining biological fluids that reflect well the physiological and pathological processes within the eye is the reason for the constant search for the appropriate biological material. Recent years' research indicates that the aqueous humor is a potentially good material for the determination of biochemical parameters. Obtained results showed that among the several determined cytokines with pro and anti-inflammatory properties, due to the observed changes in their concentrations in the aqueous humor of patients, IL-4, IL-6, IL-8, GM-CSF, INF- γ , MCP-1, MIP-1, MIP-1 β as well as TGF- β 1 and TGF- β 2 deserve special attention. These proteins appear to play an important role in both the pathomechanism and progression of corneal dystrophy, but their mechanisms of action are not well understood, hence the need for further research in this area.

Keywords: corneal dystrophies, cytokines, aqueous humor



Przeciwciała monoklonalne – leczenie biologiczne w terapii ciężkiej astmy oskrzelowej w Polsce

1. Wprowadzenie

Astma oskrzelowa jest chorobą cywilizacyjną, na którą choruje na świecie 300 milionów ludzi, a do roku 2025 zachoruje kolejne 100 mln [1]. W Polsce choruje na nią 12% populacji. GINA (ang. *The Global Initiative for Asthma*) tak definiuje astmę:

Astma to heterogenna choroba, która zazwyczaj charakteryzuje się przewlekłym zapaleniem dróg oddechowych. Jest definiowana przez zespół objawów ze strony dróg oddechowych takich jak świsty, duszność, ucisk w klatce piersiowej i kaszel, a objawy te zmieniają się w czasie i mają różne nasilenie, a towarzyszy im zmienne ograniczenie wydechowego przepływu powietrza (obturacyja) [2].

Ciężka astma leczona jest glikokortykosteroidami (GKS) wziewnymi i systemowymi. Ich stosowanie wiąże się z występowaniem wielu skutków ubocznych. Alternatywą dla leczenia GKS są nowoczesne leki biologiczne, będące przeciwciałami monoklonalnymi (mAbs). Należą do nich omalizumab – przeciwciało anty IgE, reslizumab, mepolizumab oraz benralizumab – przeciwciała anty IL-5, jak również dupilumab – przeciwciało anty IL-4.

Celem pracy jest przedstawienie procesu kwalifikacji do refundowanego leczenia biologicznego astmy ciężkiej w ramach programu lekowego B.44. w Polsce oraz ocena jego dostępności. Praca opisuje również mechanizmy działania wyżej wymienionych leków biologicznych na podstawie dostępnego piśmiennictwa. Analiza struktury, specyfiki, pochodzenia i działania mechanizmów immunologicznych mAbs prowadzi do lepszego zrozumienia potencjału zastosowania mAbs w terapii ciężkiej astmy oskrzelowej. Przewaga mAbs jako leków biologicznych opiera się na indywidualnym doborze leku do potrzeb pacjenta, co pozwala na lepszą kontrolę choroby. Celem pracy jest ponadto zwiększenie świadomości o możliwościach zastosowania nowoczesnych leków biologicznych u pacjentów cierpiących na ciężką astmę oskrzelową – wskazanie u jakiego pacjenta terapia przyniesie największe korzyści kliniczne oraz jakie przeciwwskazania uniemożliwiają jej włączenie. Dzięki popularyzacji wiedzy o mAbs możliwe będzie udzielenie pomocy osobom cierpiącym na ciężką astmę oskrzelową, co wpłynie na poprawę jakości ich życia. W Przeprowadzono przegląd literatury bazy danych PubMed oraz GoogleScholar.

2. Astma jako choroba cywilizacyjna

Wysoki wskaźnik zachorowań na astmę w społeczeństwach rozwiniętych lub zurbanizowanych jest przyczyną dla której określana jest ona jako „choroba cywilizacyjna”. Astma należy do kategorii chorób alergicznych, które na ogół powstają w wyniku

¹ ag112738@stud.ur.edu.pl, Studenckie Koło Immunologii Uniwersytetu Rzeszowskiego, Kolegium Nauk Medycznych, Uniwersytet Rzeszowski.

nadwrażliwości na czynniki środowiskowe [3]. Obserwuje się wzrost częstości występowania tychże chorób. Wiąże się z tym hipoteza higieniczna, która sugeruje, że przesadne przestrzeganie higieny, które zmniejsza ryzyko zakażeń w okresie dzieciństwa, odpowiada jednocześnie za zwiększenie zapadalności na astmę i choroby alergiczne. Istotnie mniejsze ryzyko wystąpienia astmy lub alergii miały osoby, które w dzieciństwie, miały codzienny kontakt z innymi dziećmi, mieszkały w domu z ogrodem, pomagały przy pracach w gospodarstwie rolnym i miały kontakt ze zwierzętami gospodarczymi [4]. Jak podaje badanie Epidemiologia Chorób Alergicznych w Polsce (ECAP) na astmę cierpi od 4 do 5 milionów osób [5]. Leczenie astmy jest obciążeniem dla budżetu. Według badania Cost of Asthma Exacerbation (COAX) jeśli zaostrzenie astmy u pacjenta wymagało jego hospitalizacji koszt wynosił prawie 4000 zł. Jeśli hospitalizacja nie była wymagana zaostrzenie kosztowało 247 zł [6].

3. Dotychczasowe leczenie

Podstawą farmakoterapii astmy są glikokortykosteroidy, leki wziewne, rozszerzające oskrzela z grup krótko i długo działających agonistów receptorów b₂-adrenergicznych oraz krótko i długo działających leków antycholinergicznych. Większość leków przeciwastmatycznych to leki podawane wziewnie, bezpośrednio do miejsca, gdzie toczy się proces zapalny [7]. Zastosowanie wyżej wymienionych farmaceutyków wraz z zalecaną terapią nefarmakologiczną w 85-90% przypadków pozwala na osiągnięcie zadowalającej kontroli choroby. Jednakże wśród chorych na astmę można wyróżnić grupę, stanowiącą około 10-15%, którą stanowią cierpiący na tak zwaną astmę ciężką. W jej przypadku standardowe leczenie może być niewystarczające do uzyskania kontroli choroby. Dzieje się tak między innymi ze względu na wstępowanie względnej niewrażliwości na kortykosteroidy w jej przebiegu. U pacjentów z astmą ciężką zastosowanie wysokich dawek tych leków daje ograniczone efekty. Stosowanie w praktyce klinicznej sterydów systemowych wiąże się oczywiście z wysokim ryzykiem występowania wielu objawów ubocznych. Niewrażliwość na nie może powstawać na drodze wielu mechanizmów. Podejrzewa się, że w większości dotyczą one zmian właściwości receptorów glikokortykosteroidowych [8].

4. Udział cytokin w patofizjologii astmy

W patofizjologii astmy oskrzelowej bierze udział wiele czynników zapalnych – cytokin. Należą do nich między innymi interleukina 4 (IL-4), interleukina 5 (IL-5) oraz interleukina 13 (IL-13). Eozynofilia pozostaje kluczową cechą astmy. Eozynofile stanowią niski odsetek leukocytów w prawidłowym stanie zdrowia, jednak podczas choroby, IL-4, IL-5 i IL-13 mogą indukować szybką eozynofilozę, wydłużać przeżycie eozynofili i ułatwiać ich przemieszczanie się do miejsca uszkodzenia.

Interleukina 4 jest niezbędna w procesie różnicowania limfocytów Th2 z Th0. Źródłem IL-4 są inne dojrzałe limfocyty typu Th2, limfocyty NKT (*natural killer T-cells*), komórki tuczne i bazofile. Przesunięcie równowagi immunologicznej zachodzącej pomiędzy limfocytami, w postaci wzrostu frakcji Th2, odgrywa kluczową rolę w powstawaniu zapalenia w chorobach alergicznych. Limfocyty Th2 działają wielokierunkowo na limfocyty typu B, komórki tuczne i bazofile, eozynofile oraz komórki kubkowe nabłonka w błonach śluzowych. IL-4 odpowiada za różnicowanie i proliferację limfocytów B, wytwarzanie IgE oraz IgG4, wytwarzanie czynnika stymulującego

tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów oraz czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów. IL-4 ponadto reguluje migrację eozynofili do tkanek. W organizmie receptory dla IL-4 znajdują się na limfocytach T i B, na komórkach tucznych, monocytach, makrofagach, fibroblastach czy komórkach krwiotwórczych. Receptor dla IL-4 posiada w swej budowie podjednostkę α , która jest wspólna zarówno dla IL-4, jak i dla IL-13. Podobieństwo IL-13 do IL-4 umożliwia nie tylko łączenie się z tą samą jednostką receptorową, ale również promocję proliferacji limfocytów B, zmianę klasy syntetyzowanych przeciwciał IgE na IgG4, rekrutację eozynofili oraz różnicowanie komórek dendrytycznych, co prowadzi do nadmiernego pobudzenia szlaku zapalnego zależnego od limfocytów Th2 [9, 10].

Interleukina 5 jest cytokiną wytwarzaną przez limfocyty T. Glikoproteina ta zbudowana jest z homodimerów połączonych mostkami dwusiarczkowymi. Gen kodujący IL-5 znajduje się na chromosomie 5, w pobliżu genu kodującego IL-13 oraz IL-4. IL-5 indukuje aktywację eozynofili przez nasilenie procesów adhezji, ekspresję receptorów błonowych, chemotaksję, wywarzanie cytokin i innych mediatorów. Do charakterystycznych cech astmy zalicza się napływ eozynofili oraz ich aktywację w błonie śluzowej oskrzeli. Zaobserwowano związek eozynofili w drogach oddechowych z nadreaktywnością oskrzeli, obturacją oraz objawami klinicznymi u pacjentów cierpiących na astmę. Granulocyty kwasochłonne są ważnym źródłem mediatorów, wywołujących obturację dróg oddechowych, takich jak leukotrien C4. IL-5 jest uważana za główną cytokinę w procesach różnicowania, migracji, aktywacji oraz przeżyciu eozynofili w miejscach objętych zapaleniem alergicznym. Stosowanie leków działających na granulocyty kwasochłonne prowadzi do lepszej kontroli astmy ciężkiej, ponieważ u około 50% pacjentów obserwuje się przetrwałe zapalenie eozynofilowe. Podanie przeciwciał monoklonalnych przeciwko tej cytokinie hamuje rozwój indukowanej alergenem eozynofili w drogach oddechowych i nadreaktywności oskrzeli. Eozynofile mogą być również ważnym źródłem transformującego czynnika wzrostu b u chorych na astmę, którego działanie wywołuje zmiany strukturalne w drogach oddechowych. Z tego powodu IL-5 może być wykorzystana w terapii bardziej zaawansowanych postaci astmy, w których występuje przebudowa drzewa oskrzelowego. Stosowanie mAbs przeciwko IL-5 (mepolizumab) znacząco zmniejsza częstość zaostrzeń choroby, liczbę eozynofili we krwi obwodowej i płwocinie oraz poprawia jakość życia pacjentów [9, 11-13].

Interleukina 13 osiąga znacznie wyższe poziomy w surowicy u pacjentów z ciężką astmą w porównaniu ze zdrowymi osobami. IL-13 ma wspólne cechy strukturalne z interleukiną-4, z którą jest homologiczna w 25%. IL-13 przekazuje sygnał przez wspólny receptor z IL-4. IL-13 może również wiązać alfa 2 IL-13 (IL-13R α 2). IL-13R α 2 u ludzi jest głównie cząsteczką wewnątrzkomórkową, a nie związaną z błoną, zarówno w pierwotnych komórkach nabłonka oskrzeli, jak i w fibroblastach. Badania sugerują, że ten receptor pośredniczy w sygnalizacji IL-13 i indukuje wytwarzanie TGF- β . IL-13 występuje obficie w eozynofilach i po uwolnieniu może bezpośrednio koordynować odpowiedź zapalną z udziałem innych immunomodulatorów. Podwyższone poziomy IL-13 w surowicy mogą być częściowo konsekwencją uwalniania jej zarówno z dróg oddechowych, jak i eozynofili we krwi. U pacjentów z postacią umiarkowaną do ciężkiej, stężenie IL-13 w surowicy była silnie dodatnio skorelowane z liczbą eozynofili we krwi. IL-13 indukuje cechy patofizjologiczne astmy również niezależnie od immunoglobuliny E i eozynofili. Zatem IL-13 ma kluczowe znaczenie dla astmy



indukowanej alergeniem, ale działa poprzez mechanizmy inne niż te, które są klasycznie zaangażowane w odpowiedzi alergiczne. Badania eksperymentalne i kliniczne wykazały, że IL-13 jest ważną cytokiną w przewlekłym zapaleniu dróg oddechowych i została przedstawiona jako potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu astmy [14-17].

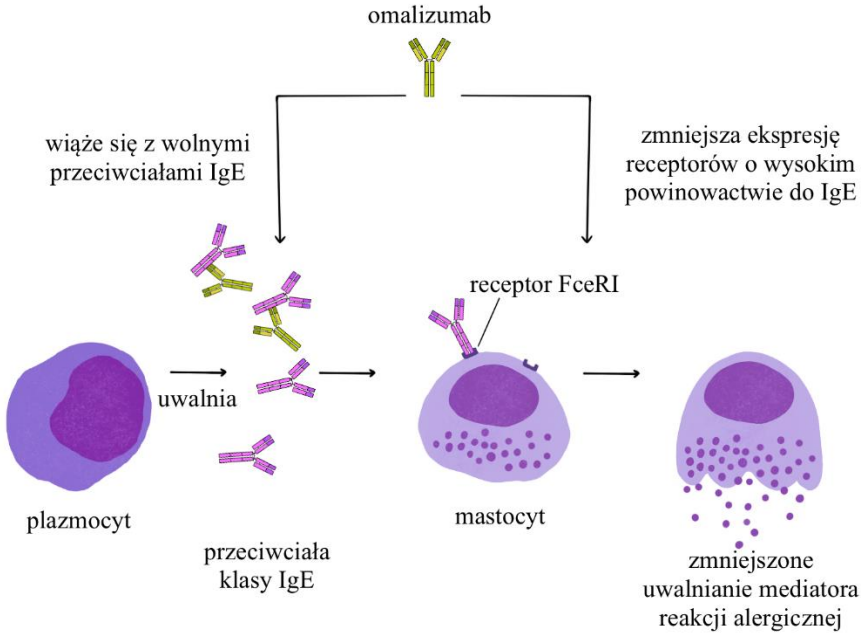
Rola opisywanych interleukin w patofizjologii astmy jest przedmiotem licznych badań. Próby zahamowania aktywności obu cytokin w leczeniu astmy dają podstawy tworzenia nowych metod leczenia oraz są początkiem do tworzenia programów terapeutycznych.

5. Przeciwciała monoklonalne w terapii astmy – mechanizm działania

Przeciwciała monoklonalne, których metodę wytwarzania opracowali w 1975 r. Milstein i Köhler, znalazły trwałe zastosowanie w klinice. Również w terapii ciężkiej astmy oskrzelowej wykorzystywane są obecnie nowoczesne preparaty z tej grupy. [18]. Od 1.11.2012 r. w Polsce w ramach programu lekowego B.44. dostępny jest omalizumab, od 1.11. 2017 r. mepolizumab, od 1.11.2019 r. benralizumab. Dupilumab i reslizumab nie są jeszcze dostępne [19]. W 2002 r. omalizumab został oficjalnie zarejestrowany w Australii do leczenia chorych na ciężką astmę alergiczną. Następnie w roku 2005 preparat dopuszczono do użytku w tym celu w USA i UE [20]. Mepolizumab został dopuszczony do użytku medycznego na terenie Unii Europejskiej w grudniu 2015 r. [21]. Benralizumab został zarejestrowany najpierw w Stanach Zjednoczonych przez Federalną Agencję do spraw Leków (FDA) w listopadzie 2017 roku, następnie w Japonii i Unii Europejskiej w styczniu 2018 roku [22].

Omalizumab jest rekombinowanym humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym, w klasie IgG (IgG1-kappa). Wiąże się on wybiórczo z ludzką immunoglobuliną E (IgE) krążącą we krwi. Łączy się z nią w miejscu domeny Ce3 łańcucha ciężkiego tworząc kompleks IgE-antyIgE. Skutkuje to zmniejszeniem ilości wolnej IgE, zdolnej do związania z receptorami komórek efektorowych i wyzwolenia reakcji zapalnej, będącej istotą patofizjologii astmy. Stężenie IgE we krwi jest zależne od dawki leku. Mechanizm działania omalizumabu prowadzi do zahamowania lub osłabienia reakcji alergicznej [23]. Lek ten również przyspiesza dysocjację IgE, które zdążyły związać się z receptorem FcεRI na powierzchni mastocytów. Podczas stosowania omalizumabu pula krążących we krwi granulocytów zasadochłonnych pozostaje stała, ale zmniejsza się liczba receptorów FcεRI na komórkach tucznych. Powoduje to obniżenie progu ich pobudliwości, co skutkuje zmniejszeniem uwalniania histaminy z bazoofilów o ok. 90% [24]. Omalizumab hamuje napływ eozynofili oraz remodeling tkanek w przebiegu astmy oskrzelowej. Zapobiega również zmianom funkcjonalnym w drogach oddechowych. W przypadku nieuzyskania kontroli choroby na stopniu 4. i 5. leczenia GINA rekomenduje omalizumab jako opcję terapeutyczną. Lek odznacza się również dobrą tolerancją – częstość występowania działań niepożądanych jest porównywalna z placebo. Istnieją czynniki, których występowanie u pacjentów może obniżać skuteczność Omalizumabu. Należą do nich: wiek, otyłość, choroby współistniejące, palenie tytoniu, polipy nosa [25]. Wykorzystywany jest on w terapii ciężkiej astmy alergiczej IgE zależnej. W ramach programu lekowego podaje się go w dawce od 75 do 600 mg w 1 do 4 wstrzyknięć. Maksymalna zalecana dawka wynosi 600 mg omalizumabu przy schemacie dawkowania co 2 tygodnie. Szczegółowy schemat dawkowania określony jest na podstawie wyjściowego stężenia IgE (j.m./ml), oznaczonego przed rozpo-

częściem leczenia oraz masy ciała pacjenta (kg) [19]. Terapia omalizumabem cechuje się bardzo wysoką skutecznością – poprawę odnotowuje się u 70-90% leczonych tak pacjentów. Przy stosunkowo niskim ryzyku objawów niepożądanych i nietolerancji poprawia kontrolę choroby, zmniejsza częstość zaostrzeń i zapotrzebowanie na doustne GKS. U niektórych chorych uzyskana poprawa jest na tyle znaczna, że pozwala nawet całkowicie odstawić GKS [26].



Rysunek 1. Mechanizm działania omalizumabu. Omalizumab wiąże się z IgE, tworząc w ten sposób kompleksy immunologiczne. Prowadzi to do obniżenia poziomu krążącej wolnej IgE i zapobiega wiązaniu jej z receptorami IgE o wysokim powinowactwie (FcεRI). Receptory te są obecne na powierzchni komórek dendrytycznych, komórek tucznych (mastocytów), bazofilów i eozynofili. Hamowana jest degranulacja komórek tucznych/bazofilów oraz naciek eozynofili. Zmniejszona zostaje ekspresja FcεRI. Efektem jest zmniejszenie alergicznego zapalenia dróg oddechowych, a także związanych z nim objawów i zaostrzeń astmy, rycina – opracowanie własne [20, 27].

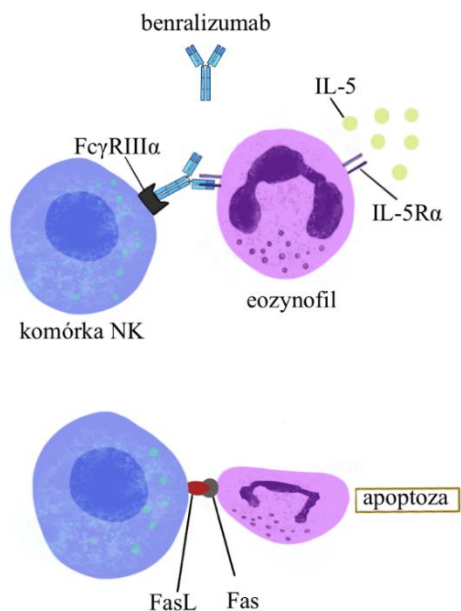
Mepolizumab to humanizowane przeciwciało monoklonalne (IgG1, kappa) skierowane przeciwko ludzkiej IL-5. Ma do niej wysokie powinowactwo i swoistość. Mepolizumab hamuje aktywność biologiczną IL5 poprzez blokowanie wiązania się IL-5 z łańcuchem alfa kompleksu receptora IL-5 znajdującego się na powierzchni eozynofili [28, 29]. W badaniach klinicznych u dorosłych pacjentów z astmą dotyczących farmakodynamiki leku, wykazano, że po podaniu podskórnym mepolizumabu w dawkach od 12,5 do 250 mg lub 75 mg dożylnie co 4 tygodnie przez 12 tygodni, liczba eozynofili we krwi obwodowej istotnie się zmniejszyła w porównaniu z grupą pacjentów otrzymujących placebo. Mepolizumab podawany dożylnie w dawce 750 mg co 4 tygodnie przez 3 miesiące u pacjentów z astmą łagodną, istotnie statystycznie obniżał liczbę eozynofili we krwi obwodowej, drogach oddechowych i szpiku (odpowiednio 100, 55 i 52% w stosunku do wartości wyjściowych). W Europie mepolizumab ma rejestrację od 6. r.ż., niestety, w Polsce refundacją leczenia objęci są pacjenci dopiero od 18. r.ż.



Mepolizumab jest pierwszym przedstawicielem przeciwciał monoklonalnych przeciwko IL-5. Został zaakceptowany do rutynowej praktyki klinicznej przez FDA w listopadzie 2015 r. [19]. Aktualne dane w piśmiennictwie przemawiają za stosowaniem mepolizumabu u pacjentów z ciężką postacią astmy eozynofilowej. Kolejnym etapem będzie odkrycie biomarkerów, które umożliwiłyby klinicytom zidentyfikowanie pacjentów, którzy odnieśliby największe korzyści z tego leczenia.

Benralizumab jest humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym klasy IgG1k, które wykazuje powinowactwo do pierwszej domeny fibronektyny łańcucha receptora IL-5R. Wiązanie benralizumabu hamuje oddziaływanie między IL-5 a jej receptorem. IL-5 promuje eozynofilopoezę w szpiku kostnym oraz bierze udział w aktywacji, migracji i przeżyciu eozynofili w miejscu zapalenia. W patofizjologii astmy prowokacja alergenem prowadzi do zwiększonej aktywacji eozynofili w drogach oddechowych. Ponieważ eozynofile są dominującymi komórkami efektorowymi w astmie, hamowanie ich aktywności prowadzi do zmniejszenia uszkodzenia dróg oddechowych, zmniejszenia wydzielania śluzu oraz ogranicza nadreaktywność oskrzeli. Schemat dawkowania zakłada stosowanie początkowo 30 mg co 4 tyg. (3 dawki), od 4. dawki 30 mg co 8 tyg. Lek jest przeznaczony do długotrwałego stosowania. Decyzję o kontynuacji leczenia należy podejmować co najmniej raz na rok na podstawie stopnia nasilenia choroby, kontroli zaostrzeń i liczby eozynofili we krwi. Leku nie należy stosować w leczeniu nagłych zaostrzeń astmy. Nie zaleca się nagłego przerywania podawania kortykosteroidów po rozpoczęciu leczenia benralizumabem, dawki kortykosteroidów należy zmniejszać stopniowo. Po podaniu leku występowały ciężkie reakcje ogólnoustrojowe, w tym reakcje anafilaktyczne i reakcje nadwrażliwości. Mogą one wystąpić w ciągu kilku godzin lub dni po podaniu leku. Nie wiadomo, czy benralizumab wpływa na odpowiedź pacjenta na zarażenie pasożytami jelitowymi. W przypadku zarażenia chorego pasożytami jelitowymi w trakcie leczenia benralizumabem i braku odpowiedzi na leczenie przeciwpasożytnicze, stosowanie benralizumabu należy przerwać do czasu ustąpienia zarażenia. Benralizumab jest skuteczny i bezpieczny w leczeniu osób dorosłych z niekontrolowaną ciężką astmą eozynofilową, którzy nie uzyskali jej kontroli pomimo stosowania wysokich dawek wziewnych GKS i LABA. Mepolizumab i reslizumab blokują tylko aktywację eozynofili poprzez neutralizację krążącej IL-5, jednak nie wywołują apoptozy już aktywowanych eozynofili. Benralizumab indukuje szybką i niemalże całkowitą deplecję eozynofili we krwi (>95%), która jest wyższa niż indukowana przez mepolizumab (84%) i reslizumab (82%). Efekt utrzymuje się przez 12 tygodni po podaniu pojedynczej dawki od 0,3 do 3 mg/kg. Spadkowi liczby eozynofili we krwi towarzyszy zmniejszenie stężenia w surowicy neurotoksyny pochodzenia eozynofilowego i białka kationowego eozynofili oraz zmniejszenie liczby bazofilów we krwi. Obserwuje się również poprawę czynności płuc, lepszą kontrolę astmy i jakość życia, zwłaszcza w przypadku pacjentów z wyjściową liczbą eozynofili ≥ 300 komórek/ μ l i częstszym występowaniem zaostrzeń przed włączeniem leczenia biologicznego [29-32].

Wyżej wymienione leki są refundowane w Polsce w ramach programu lekowego B.44 „Leczenie ciężkiej astmy alergicznej IgE-zależnej oraz ciężkiej astmy eozynofilowej”. Istnieją również dwa inne preparaty będące mAbs, które zostały dopuszczone do terapii ciężkiej astmy. Są to dupilumab i reslizumab [19].



Rysunek 2. Mechanizm działania benralizumabu. Benralizumab charakteryzuje się podwójnym mechanizmem działania. Poprzez fragmenty Fab, benralizumab wiąże się z $IL-5R\alpha$, hamując w ten sposób oddziaływanie między $IL-5$ a jej receptorem. Ponadto, poprzez region stały Fc, benralizumab oddziałuje z receptorem $Fc\gamma RIII\alpha$ obecnym na powierzchni komórek NK, tym samym wywołując apoptozę eozynofili indukowaną przez ADCC, za pośrednictwem mechanizmów zależnych od ligandu Fas/Fas, rycina – opracowanie własne [30]

Dupilumab to humanizowane mAbs przeciwko podjednostce α receptora dla $IL-4$ ($IL-4R\alpha$). Blokuje on działanie $IL-4$ oraz $IL-13$, co prowadzi do hamowania $Th2$ -zależnych procesów zapalnych, ze względu na fakt, że cytokiny interleukina 4 ($IL-4$) i $IL-13$ oraz heterodimeryczne kompleksy receptora $IL-4$ ($IL-4R$), z którymi oddziałują, odgrywają kluczową rolę w patogenezie zaburzeń alergicznych. Interleukina 4 sprzyja rozwijaniu się limfocytów $Th2$ z $Th0$, reguluje produkcję przeciwciał IgE , reguluje migrację eozynofili do tkanek oraz wpływa na proliferację komórek tłuszczowych. Podobna w budowie i funkcji jest interleukina 13 ($IL-13$), która wzmacnia proliferację pobudzonych limfocytów B oraz zmianę klasy syntetyzowanych przeciwciał z IgE na $IgG4$ alergenowo swoistych. Zarówno $IL-4$, jak i $IL-13$ posiadają wspólną podjednostkę α na receptorze dla $IL-4$ ($IL-4R\alpha$). W astmie leczenie dupilumabem przyczynia się do hamowania limfocytów B, inhibicji przełączania klas przeciwciał, zmniejszenia stężenia krążącej eotaksyny, ale i obniżenia całkowitego poziomu przeciwciał IgE i swoistych IgE oraz zmniejszenia stężenia wydychanego tlenu azotu ($FeNO$). Według charakterystyki produktu leczniczego (ChPL) dupilumab jest zarejestrowany do leczenia ciężkiej astmy u dorosłych i młodzieży od 12. r.ż. charakteryzującej się zwiększonym stężeniem eozynofili we krwi obwodowej lub zwiększonym stężeniem wydychanego tlenu azotu ($FeNO$) [33, 34].

Reslizumab został zaakceptowany do użytku klinicznego przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) w Stanach Zjednoczonych Ameryki 23 marca 2016 r., natomiast mepolizumab 4 listopada 2015 r. W chwili obecnej jedynym zarejestro-



wanym wskazaniem do zastosowania tych substancji jest ciężka astma eozynofilowa, w której stosowanie dotychczas dostępnych leków było niewystarczające, aby zapobiec wystąpieniu zaostrzenia choroby. Reslizumab jest dopuszczony do stosowania u pacjentów powyżej 18. r.ż., zaś mepolizumab – powyżej 12. r.ż. Pacjenci otrzymujący reslizumab wykazywali znacznie większą redukcję liczby eozynofili w płwocinie, poprawę czynności dróg oddechowych i tendencję do lepszej kontroli astmy niż pacjenci otrzymujący placebo. W badaniach reslizumab był ogólnie dobrze tolerowany. Terapia anti-IL-5 reslizumabem w leczeniu pacjentów z ciężką, oporną na leczenie astmą eozynofilową była skuteczna w poprawie czynności płuc i wykazywała tendencję do większej kontroli astmy, zwłaszcza u pacjentów z polipami nosa. Był dobrze tolerowany u pacjentów z niewystarczająco kontrolowaną astmą (pomimo standardowej terapii) i podwyższonym poziomem eozynofili we krwi. W badaniach klinicznych dawka reslizumabu 3,0 mg/kg zapewniła większą poprawę wyników leczenia astmy w porównaniu z dawką 0,3 mg/kg, przy porównywalnym bezpieczeństwie [35, 36].

6. Zasady kwalifikowania do leczenia biologicznego astmy

W leczeniu astmy ciężkiej nastąpił duży postęp. Obecnie polscy pacjenci mogą bezpłatnie korzystać z najnowocześniejszych terapii biologicznych dostępnych w ramach programu lekowego, który od listopada 2017 roku funkcjonuje pod nazwą „Leczenie ciężkiej astmy alergicznej IgE-zależnej oraz ciężkiej astmy eozynofilowej”. Międzynarodowe standardy diagnostyki i leczenia wskazują, że w astmie ciężkiej leczeniem pierwszego wyboru po nieskutecznym leczeniu wziewnym powinny być właśnie leki biologiczne, a nie stosowane wcześniej GKS systemowe, które wiążą się ze zwiększonym ryzykiem skutków ubocznych.

Do leczenia biologicznego w ciężkiej astmie w ramach programu lekowego w Polsce kwalifikuje się po diagnostyce różnicowej według najnowszych wytycznych GINA. Modelowy pacjent kwalifikujący się do leczenia jest niepalący, stosuje dotychczas GKS wziewne w dawce >1000 µg oraz drugi lek kontrolujący. Ciężkie zaostrzenia astmy występują u niego 2 razy do roku lub częściej. Wyróżnia się dwa fenotypy astmy kwalifikujące do leczenia biologicznego: ciężką astmę alergiczną IgE zależną oraz ciężką astmę eozynofilową. W ramach programu lekowego pacjentów ze stwierdzoną ciężką astmą alergiczną IgE zależną leczy się omalizumabem, natomiast w przypadku ciężkiej astmy eozynofilowej podaje się mepolizumab lub benralizumab. Przeciwwskazaniami do włączenia do programu lekowego są: nadwrażliwość na omalizumab, mepolizumab, benralizumab lub substancje pomocnicze, występowanie chorób współistniejących powodujących ciężki przebieg astmy, ciąża i karmienie piersią, jednoczesna terapia lekami immunosupresyjnymi, przeciwnowotworowymi, wlewami z immunoglobulin lub innymi lekami biologicznymi lub przyjmowanie innych leków biologicznych w leczeniu astmy (np. mepolizumabu, benralizumabu) – do 3 miesięcy od zakończenia terapii.

Pacjent kwalifikujący się do leczenia omalizumabem musi przekroczyć 6 rok życia oraz prezentować ciężką, niekontrolowaną alergiczną astmą oskrzelową (wg aktualnych wytycznych GINA) z alergią na alergeny całoroczne. Alergię należy potwierdzić punktowymi testami skórnymi lub testami swoistego IgE. Dotychczas konieczne było stosowanie u niego wysokich dawek wziewnych GKS w połączeniu z innym lekiem kontrolującym astmę (długo działający agonista receptora β -2 adrenergicznego, mody-

fikator leukotrienów, długo działający bloker receptora muskarynowego). Odnotowano u niego dwa lub więcej epizodów zaostrzeń w roku wymagających stosowania systemowych GKS lub zwiększania ich dawki. Całkowite stężenie IgE w jego surowicy wynosi 30-1500 IU/ml. Należy również stwierdzić jednoznaczność reaktywności *in vitro* na alergeny całoroczne u pacjentów z całkowitym stężeniem IgE w surowicy poniżej 76 j.m./ml. Masa ciała pacjenta kwalifikującego się do leczenia biologicznego musi zawierać się w przedziale 20-150 kg. Podczas kwalifikacji należy również wykluczyć inne niż reakcja organizmu na całoroczne alergeny wziewne przyczyny powodujące ciężki przebieg astmy.

Oprócz tego pacjent musi spełnić co najmniej 2 z poniższych kryteriów:

- objawy niekontrolowanej astmy (brak kontroli astmy w kwestionariuszu kontroli astmy ACQ >1,5 pkt);
- hospitalizacja w ciągu ostatnich 12 miesięcy z powodu zaostrzenia astmy;
- incydent ataku astmy zagrażający życiu w przeszłości;
- utrzymująca się obturacja dróg oddechowych (natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa FEV1 <80% wartości należnej lub zmienność dzienna szczytowego przepływu wydechowego PEF >30%);
- pogorszenie jakości życia z powodu astmy (średnia punktów w teście kontroli jakości życia chorego na astmę miniAQLQ <5,0 punktów u dorosłych i dzieci w wieku 12 lat i więcej lub PAQLQ (*Pediatric Asthma Quality of Life Questionnaire*) < 5,0 punktów u dzieci w wieku 6-11 lat).

Ciężka astma eozynofilowa leczona jest mepolizumabem lub benralizumabem. Do leczenia kwalifikują się pacjenci powyżej 18. roku życia z ciężką, oporną na leczenie astmą eozynofilową identyfikowaną poprzez liczbę eozynofili we krwi na poziomie ≥ 350 komórek/ μ l. Ich terapia astmy wiązała się z koniecznością stosowania wysokich dawek wziewnych GKS (>1000 mcg dipropionianu beklometazonu na dobę lub innego wziewnego GKS w dawce równoważnej określonej zgodnie z aktualnymi wytycznymi GINA) w połączeniu z innym lekiem kontrolującym astmę (długo działający agonista receptora β -2 adrenergicznego, modyfikator leukotrienów, długo działający bloker receptora muskarynowego). Pacjenci kwalifikujący się do leczenia biologicznego odnotowali przynajmniej dwa epizody zaostrzeń w ostatnim roku wymagające stosowania systemowych GKS lub zwiększenia ich dawki na okres dłuższy niż trzy dni u osób, które stosują je przewlekłe. Zaostrzenia te mogły wymagać hospitalizacji lub wizyty w oddziale ratunkowym. Badanie spirometryczne wykazało natężoną objętość wydechową pierwszo-sekundową FEV1 <80% wartości należnej przed podaniem leku rozszerzającego oskrzela w czasie wizyty kwalifikacyjnej. Pomimo stosowania leczenia występują u nich objawy niekontrolowanej astmy (brak kontroli astmy w kwestionariuszu kontroli astmy ACQ>1,5 pkt) i pogorszenie jakości życia z powodu astmy (średnia punktów w teście kontroli jakości życia chorego na astmę Mini Asthma Quality of Life Questionnaire <5,0 punktów). W przypadku astmy eozynofilowej należy wykluczyć inne zespoły hypereozynofilii oraz zakażenie pasożytnicze (na podstawie prawidłowego wyniku badania kału). Wymagane jest również wykluczenie innych istotnych klinicznie chorób płuc.



Tabela 1 Charakterystyka modelowego pacjenta kwalifikującego się do refundowanego leczenia biologicznego ciężkiej astmy

Kryteria kwalifikacji do leczenia	Ciężkiej astmy alergicznej IgE zależnej omalizumabem	Ciężkiej astmy eozynofilowej mepolizumabem/benralizumabem
Diagnoza	Ciężka, niekontrolowana alergiczna astma oskrzelowa z alergią na alergeny całoroczne. Alergię należy potwierdzić punktowymi testami skórnymi lub testami swoistego IgE.	Ciężka, oporna na leczenie astma eozynofilowa identyfikowana poprzez liczbę eozynofili we krwi na poziomie ≥ 350 komórek/ μ l
Dotychczasowe leczenie	stosuje dotychczas GKS wziewne w dawce >1000 μ g oraz drugi lek kontrolujący	stosuje dotychczas GKS wziewne w dawce > 1000 μ g oraz drugi lek kontrolujący
Nałóg tytoniowy	Pacjent musi być niepalący	Pacjent musi być niepalący
Zaostrzenia astmy	2 razy do roku lub częściej, wymagające stosowania systemowych GKS lub zwiększania ich dawki	2 razy do roku lub częściej, wymagające stosowania systemowych GKS lub zwiększania ich dawki
Wiek	powyżej 6. roku życia	powyżej 18. roku życia
Masa ciała	20-150 kg	
Trwająca ciąża lub karmienie piersią	wyklucza włączenie leczenia omalizumabem	wyklucza włączenie leczenia mepolizumabem/benralizumabem
Terapia lekami immunosupresyjnymi, przeciwnowotworowymi lub innymi lekami biologicznymi	Okres krótszy niż 3 miesiące od zakończenia terapii wyklucza włączenie leczenia omalizumabem	Okres krótszy niż 3 miesiące od zakończenia terapii wyklucza włączenie leczenia mepolizumabem/benralizumabem
Chorób współistniejące powodujące ciężki przebieg astmy	wykluczają włączenie leczenia omalizumabem	wykluczają włączenie leczenia mepolizumabem/benralizumabem
nadwrażliwość na substancję czynną lub substancje pomocnicze	wyklucza włączenie leczenia omalizumabem	wyklucza włączenie leczenia mepolizumabem/benralizumabem
Dodatkowe kryteria	Oprócz tego pacjent musi spełnić co najmniej 2 z poniższych kryteriów: 1. objawy niekontrolowanej astmy 2. hospitalizacja w ciągu ostatnich 12 miesięcy z powodu zaostrzenia astmy; 3. incydent ataku astmy zagrażający życiu w przeszłości; 4. utrzymująca się obturacja dróg oddechowych 5. pogorszenie jakości życia z powodu astmy	Badanie spirometryczne wykazało natężoną objętość wydechową pierwszo-sekundową FEV1 $<80\%$ wartości należnej przed podaniem leku rozszerzającego oskrzela w czasie wizyty kwalifikacyjnej. 1. objawy niekontrolowanej astmy 2. pogorszenie jakości życia z powodu astmy W przypadku astmy eozynofilowej należy wykluczyć inne zespoły hypereozynofilii oraz zakażenie pasożytnicze (na podstawie prawidłowego wyniku badania kału). Wymagane jest również wykluczenie innych istotnych klinicznie chorób płuc.

Źródło: opracowanie własne na podstawie [37]

Czas leczenia w programie określa lekarz prowadzący. Po upływie 24 miesięcy od podania pierwszej dawki danego leku biologicznego leczenie zostaje zawieszane. W trakcie zawieszenia terapii pacjent pozostaje w programie lekowym i jest obserwowany w zakresie kontroli astmy (wizyty co 4-6 tygodni), a w przypadku istotnego pogorszenia kontroli choroby lekarz może zdecydować o ponownym rozpoczęciu podawania leku. (tj. tej samej substancji czynnej) stosowanego przed zawieszeniem terapii. Chory może być ponownie zakwalifikowany do terapii lekiem biologicznym o ile spełni kryteria włączenia i nie spełni żadnego z kryteriów wyłączenia. U chorych, u których w okresie 12 miesięcy od dnia zawieszenia terapii nie dojdzie do istotnego pogorszenia kontroli astmy, leczenie omalizumabem, mepolizumabem lub benralizumabem oraz udział w programie lekowym ulega zakończeniu. W przypadku zająścia w ciężę leczenie omalizumabem, mepolizumabem lub benralizumabem zostaje zawieszane. W trakcie zawieszenia terapii pacjentka pozostaje w programie lekowym i jest obserwowana w zakresie kontroli astmy (wizyty co 4-6 tygodni). Po porodzie i okresie karmienia piersią lekarz może zdecydować o ponownym rozpoczęciu podawania leku w przypadku istotnego pogorszenia kontroli choroby.

Kryteria wyłączenia z leczenia w przypadku terapii omalizumabem to: ocena odpowiedzi na terapię przez lekarza prowadzącego wg skali GETE (*Global evaluation of treatment effectiveness*) niższa niż bardzo dobra (całkowita kontrola astmy), dobra (znacząca poprawa kontroli astmy) lub spełnienie 2 z 3 poniższych kryteriów:

- poprawa kontroli astmy w kwestionariuszu kontroli astmy ACQ o $\geq 0,5$ punktu (w porównaniu z wizytą w tygodniu zakwalifikowania pacjenta do leczenia omalizumabem);
- poprawa jakości życia w teście kontroli jakości życia chorego na astmę miniAQLQ o $\geq 0,5$ punktu u dorosłych i dzieci w wieku 12 lat i więcej, PAQLQ u dzieci w wieku 6-11 lat (w porównaniu z wizytą w tygodniu zakwalifikowania pacjenta do leczenia omalizumabem);
- zmniejszenie dawki doustnego GKS o ≥ 5 mg w przeliczeniu na prednizon (w porównaniu z wizytą w tygodniu zakwalifikowania pacjenta do leczenia omalizumabem).

Kryteria wyłączenia obowiązujące w przypadku terapii omalizumabem, mepolizumabem lub benralizumabem to: wystąpienie zaostrzeń astmy (zdefiniowanych jak w pkt. 2. 1. 3) w okresie leczenia mepolizumabem lub benralizumabem w ilości równej lub przewyższającej okres poprzedzający leczenie w obserwacji rocznej, palenie tytoniu, niestosowanie się do zaleceń lekarskich lub niepoprawne przyjmowanie leków, podjęcie leczenia lekami immunosupresyjnymi, przeciwnowotworowymi, wlewami z immunoglobulin lub innymi lekami biologicznymi oraz wystąpienie któregokolwiek z przeciwwskazań do stosowania omalizumabu, mepolizumabu lub benralizumabu. Kryterium wyłączenia w programie lekowym zarówno w terapii ciężkiej astmy alergicznej IgE zależnej, jak i ciężkiej astmy eozynofilowej jest ciąża. Jest to bezwzględne przeciwwskazanie do włączenia do programu lekowego.

Dodatkowo w przypadku terapii mepolizumabem lub benralizumabem u pacjentów, którzy przed włączeniem terapii jednym z tych leków biologicznych przyjmowali przewlekle systemowe GKS brak redukcji dawki tych leków lub redukcja o $\leq 30\%$, ocena odpowiedzi na terapię przez lekarza prowadzącego wg skali GETE niższa niż: bardzo dobra lub dobra, brak poprawy kontroli astmy w kwestionariuszu kontroli astmy (wzrost ACQ o $>$ lub $= 0,5$, brak poprawy jakości życia w teście kontroli jakości życia chorego na astmę oraz w przypadku stwierdzenia zakażenia pasożytniczego opornego na leczenie – zawiesić leczenie mepolizumabem lub benralizumabem do momentu wyleczenia [37].



7. Możliwości terapii lekami biologicznymi w Polsce

W 2012 roku Minister Zdrowia ogłosił program terapeutyczny leczenia astmy ciężkiej alergicznej finansowany z budżetu Narodowego Funduszu Zdrowia, w którym nieodpłatnie podawany jest pacjentom omalizumab, a od 2017r. pojawiła się możliwość kwalifikacji do leczenia biologicznego mepolizumabem chorych na ciężką astmę eozynofilową, co znacznie rozszerzyło grupę chorych, u których można zastosować terapię biologiczną.

W przypadku podjęcia leczenia każdym z refundowanych w ramach polskiego programu lekowego leków: omalizumabem, mepolizumabem czy benralizumabem obowiązują identyczne zasady. Po pierwszym podaniu leku biologicznego pacjenci powinni być obserwowani przez co najmniej 2 godziny. Jeśli pierwsze podanie leku było dobrze tolerowane po drugim, trzecim i czwartym podaniu, czas obserwacji pacjenta można skrócić do 30 minut. Pacjent odbywa w ośrodku minimum cztery wizyty w odstępach zgodnych z dawkowaniem leku. Podczas wizyt pacjent edukowany jest w zakresie administrowania leku – samodzielnego lub przez opiekuna prawnego. Pacjent lub opiekunowie prawni pacjenta muszą być poinstruowani odnośnie techniki podawania leku, prowadzenia dziennika leczenia oraz rozpoznawania działań niepożądanych (ciężkich reakcji alergicznych) i czynności, które należy podjąć w przypadku ich wystąpienia. Pacjent otrzymuje leki w ośrodku prowadzącym terapię astmy danego pacjenta. Leczenie każdym z refundowanych leków biologicznych może być kontynuowane w warunkach domowych, jeśli lekarz i pacjent uznają to za właściwe. Lek może być wydany dla celów terapii domowej na okres nie przekraczający 3 miesięcy.

Ośrodki prowadzące program leczenia biologicznego astmy znajdują się na terenie każdego województwa – ich zestawienie znajduje się w tabeli 1. W związku z tym pacjenci mają zapewniony dostęp do ww. leczenia bez konieczności udawania się do innego województwa. Dzięki temu dostęp do leczenia jest zapewniony większemu gronu pacjentów, dzięki zlikwidowaniu barier komunikacyjnych. Obniża to również koszty leczenia ponoszone przez pacjenta. Terapia w ramach programu lekowego B.44 dla osób zakwalifikowanych jest refundowana, dlatego sytuacja materialna nie jest czynnikiem wykluczającym z leczenia [37, 38].

Tabela 2 Ośrodki prowadzące leczenie astmy ciężkiej w ramach programu lekowego B.44

Województwo	Ośrodki
dolnośląskie	Centrum Medyczne Karpacz S.A. w Karpaczu, Centrum Diagnostyczno-Terapeutyczne Medicus Sp. z o.o. w Lubinie, Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu, Dolnośląskie Centrum Chorób Płuc we Wrocławiu
kujawsko-pomorskie	Szpital Uniwersytecki nr 2 im. Dr Jana Bizuela, 10. Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką, Kujawsko-Pomorskie Centrum Pulmonologii w Bydgoszczy
lubelskie	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny nr 4 w Lublinie, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Stefana Kardynała Wyszyńskiego, Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej w Lublinie, Zamojski Szpital Niepubliczny
lubuskie	105. Kresowy Szpital Wojskowy z Przychodnią SP ZOZ w Żeganii, Wojewódzki Szpital Kliniczny im. Karola Marcinkowskiego Sp. z o.o w Zielonej Górze, Lubuski Szpital Specjalistyczny Pulmonologiczno-Kardiologiczny Sp. z o.o w Torzymie



łódzkie	Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej Uniwersytecki Szpital Kliniczny nr 1 im. Norberta Barlickiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Centralny Szpital Kliniczny Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
małopolskie	Wojskowy Szpital Kliniczny z Polikliniką w Krakowie, Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej Szpital Uniwersytecki w Krakowie, Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej Szpital Uniwersytecki w Krakowie, Szpital Specjalistyczny im. Dietla w Krakowie, Samodzielny Publiczny Szpital Specjalistyczny Chorób Płuc w Zakopanem
mazowieckie	Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny w Warszawie, Centralny Szpital Kliniczny MSWiA w Warszawie, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie, Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie, Mazowiecki Szpital Specjalistyczny w Radomiu
opolskie	Samodzielny Publiczny Zakład Opieki Zdrowotnej Głuchołazy, Szpital Wojewódzki Sp. z o.o. w Opolu
podkarpackie	Kliniczny Szpital Wojewódzki nr 2 im. Św. Jadwigi Królowej w Rzeszowie, Kliniczny Szpital Wojewódzki nr 1 w Rzeszowie
podlaskie	Centrum Medycyny Oddechowej Mróz Sp.j. Uniwersytecki Szpital Kliniczny, Szpital Wojewódzki im. Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Łomży
pomorskie	Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w Gdańsku, Szpital Specjalistyczny im. F. Ceynowy w Wejherowie
śląskie	Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Bystrej, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Najświętszej Maryi Panny w Częstochowie, Uniwersyteckie Centrum Kliniczne im. prof. K. Gibińskiego Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Górnośląskie Centrum Medyczne im. prof. Leszka Gieca Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 im. Prof. Stanisława Szyszko Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Zabrze
świętokrzyskie	Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Św. Rafała, Szpital Powiatowy w Chmielniku
warmińsko-mazurskie	Samodzielny Publiczny Specjalistyczny Zakład Opieki Zdrowotnej Szpital Miejski im. Jana Pawła II w Elblągu, Szpital Pro-Medica Sp. z o.o. w Elku, Samodzielny Publiczny Zespół Gruźlicy i Chorób Płuc w Olsztynie
wielkopolskie	Wojewódzki Specjalistyczny Zespół Zakładów Opieki Zdrowotnej Chorób Płuc i Gruźlicy w Godzieszach Małych, Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu, Szpital Kliniczny Przemieniania Pańskiego w Poznaniu
zachodniopomorskie	Specjalistyczny Zespół Gruźlicy i Chorób Płuc w Koszalinie, Samodzielny Publiczny Wojewódzki Szpital Zespólny w Szczecinie

Źródło: opracowanie własne na podstawie [38]



8. Proponowane zmiany w polskim programie lekowym B.44

Występują ograniczenia możliwości leczenia w programie lekowym. Trzy z nich są aktualnie dyskutowane, w celu ich zmiany i zapewnienia dostępu do leczenia biologicznego szerszemu gronu pacjentów. Pierwszym ograniczeniem jest czas leczenia w programie lekowym. Po 24 miesiącach wymagana jest przerwa i odstawienie. Pacjent znajduje się przez następne 12 miesięcy pod obserwacją. W przypadku braku nawrotów choroby kończy swoje uczestnictwo w programie lekowym. Jeśli zaobserwowany zostanie nawrót objawów lekarz prowadzący może zdecydować o ponownym rozpoczęciu podawania leków. Jednakże 90% pacjentów wykazuje objawy nawrotu aktywnej choroby w okresie od 9 do 12 tygodni po każdym odstawieniu terapii. Prowadzi to do zmniejszenia skuteczności terapii, utraty efektów zdrowotnych uzyskanych w trakcie 24 miesięcy trwania terapii i zwiększa koszty leczenia. Wyżej opisane ograniczenie czasowe nie wynika ze względów medycznych. Polska jest jedynym krajem w Unii Europejskiej, w którym czas leczenia jest ograniczany ze względów niemiedycznych. Praktyka ta nie znajduje oparcia w badaniach klinicznych czy w zaleceniach dotyczących terapii ciężkiej astmy.

Drugą dyskutowaną kwestią jest konieczność uwzględnienia okresu wash-out podczas zmiany jednego leku biologicznego na inny. Aktualnie jednym z przeciwwskazań do rozpoczęcia terapii biologicznej w programie lekowym jest przyjmowanie innego leku biologicznego w terapii astmy w okresie do trzech miesięcy od zakończenia terapii. Konsekwencją tego zapisu było pozostawianie pacjenta podczas okresu wash-out bez spersonalizowanego leczenia biologicznego. Najnowsze publikacje wykazały, że rozpoczęcie terapii kolejnym lekiem biologicznym bez okresu wash-out nie pociąga za sobą negatywnych skutków dla zdrowia, ale zwiększa skuteczność leczenia i jest bezpieczna dla pacjentów. Panel ekspertów uznał, że w świetle przedstawionych danych uzasadnione byłoby skrócenie okresu wash-out w terapii biologicznej do dwóch miesięcy.

Usystematyzowania i wprowadzenia jednolitych zasad wymaga również kwestia stosowania równocześnie z terapią biologiczną astmy innych leków biologicznych, przeciwnowotworowych i wlewów z immunoglobulin. Aktualnie jest to przeciwwskazane w ramach programu lekowego B.44.

Szacowany koszt wyżej wymienionych zmian wyniósłby 6,46 mln zł, co zwiększyłoby średnioroczne wydatki płatnika o ok. 6,2% w okresie 3 lat [19].

9. Podsumowanie

Astma to choroba cywilizacyjna, na którą w Polsce choruje 4,5 mln osób. Zapisana w jej definicji heterogenność szczególnie wyraźnie rysuje się w obliczu dostępności nowych terapii biologicznych, które wybiórczo modyfikują ścieżki odpowiedzi immunologicznej na drodze blokowania lub pobudzania swoistych receptorów czy czynników transkrypcyjnych. Dzięki tym mechanizmom możliwe jest leczenie z uwzględnieniem różnorodności fenotypowej astmy [37]. Przeciwciała monoklonalne, takie jak omalizumab, mepolizumab i benralizumab stanowią bezpieczną i skuteczną opcję terapeutyczną dla pacjentów cierpiących na ciężką astmę alergiczną IgE zależną lub eozynofilową.

Dzięki dostępności leczenia biologicznego astmy w Polsce w ramach programu lekowego B.44 możliwe jest jego zastosowanie w grupie pacjentów cierpiących na ciężką postać astmy. Muszą oni mierzyć się z częstymi zaostrzeniami, które wymagają intensywnego leczenia, przez co częściej są zmuszeni skorzystać z pomocy doraźnej

lub pogotowia ratunkowego, częstsze w tej grupie są również hospitalizacje. Leki biologiczne zmniejszają ryzyko wystąpienia zaostrzeń, dzięki czemu możliwa jest poprawa jakości życia pacjentów oraz powrót do aktywnego życia towarzyskiego i zawodowego. Dodatkowo zastosowanie terapii biologicznej pozwala na uniknięcie skutków ubocznych wiążących się z długotrwałym stosowaniem GKS systemowych oraz jest mniej uciążliwe dla pacjenta. Forma wstrzyknięcia podskórnego oraz brak konieczności codziennego przyjmowania leków biologicznych zapewniają lepszą kontrolę choroby, co przekłada się na lepsze efekty terapeutyczne. Terapia biologiczna ma dodatkowo wysoki profil bezpieczeństwa oraz daje perspektywę na długotrwałe lub całkowite ustąpienie objawów astmy [38].

W przyszłości możliwe jest włączenie do programu lekowego nowych preparatów, takich jak reslizumab bądź dupilumab. Ten ostatni uzyskał już pozytywną rekomendację Prezesa Agencji Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji dotyczącą jego refundacji i włączenia do programu B.44 [39-41]. Dodatkowo zwiększenie dostępności zapewni wprowadzenie zmian dotyczących czasu leczenia, okresu wash-out oraz stosowaniu terapii biologicznej astmy równocześnie z innymi lekami biologicznymi, przeciwnowotworowymi i wlewami z immunoglobulin.

Literatura

1. Balińska-Miśkiewicz W., *Diagnostyka i leczenie astmy oskrzelowej u osób dorosłych*, Farmacja Polska, t. 65, nr 11, 2009, s. 793-803.
2. Global Initiative for Asthma, *Global Strategy for Asthma Management and Prevention*, 2021, www.ginasthma.org, [data dostępu 25.10.2021].
3. Kumar A., Ghosh B., *Genetics of asthma: a molecular biologist perspective*, Clinical and Molecular Allergy, 7, 2009.
4. Kowalik E., Galbarczyk A., Jasińska G., *Astma i choroby alergiczne w świetle hipotezy higienicznej*.
5. Samoliński B., Raciborski F., Lipiec A., Tomaszewska A., Krzych-Fałta E., Samel-Kowalik P., Walkiewicz A., Lusawa A., Borowicz J., Komorowski J., Samolińska-Zawisza U., Sybilski A.J., Piekarska B., Nowicka A., *Epidemiologia Chorób Alergicznych w Polsce (ECAP)*, Alergologia Polska – Polish Journal of Allergology, Tom 1, Nr 1, 2014.
6. Rysiak E., Kuczyńska A., Zareba I., Mróz R., Pałka J., *Evaluation of the treatment costs of asthma exacerbations in outpatients*, Acta Poloniae Pharmaceutica, 73, 2016.
7. Marynowski M., Likońska A., Kardas G., Panek M., *Terapie biologiczne w chorobach obturacyjnych płuc*, Pneumonologia Polska 2020, s. 102-109.
8. Łacwik P., Kupczyk M., Kuna P., *Fenotypy astmy ciężkiej w praktyce klinicznej*, Alergia Astma Immunologia 2013, Tom 18, Nr 2, s. 71-76.
9. Tomasiak-Łozowska M., Bodzenta-Łukaszyk M., Tomasiak A., Skiepmo M., Ziętkowski Z., *Rola interleukin 13 i 5 w astmie The role of interleukin 13 and interleukin 5 in asthma*, Postepy Hig Med Dosw, 64, 2010, s. 146-155.
10. Koćwin M., Kuna P., *Zastosowanie dupilumabu w astmie typu 2*, Terapia, 4, 2021.
11. Corrado *Interleukin-5 in the pathophysiology of severe asthma*. Frontiers in physiology, 10, 2019, s. 1514.
12. Hillas G., Fouka E., Papaioannou A., *Antibodies targeting the interleukin-5 signaling pathway used as add-on therapy for patients with severe eosinophilic asthma: a review of the mechanism of action, efficacy, and safety of the subcutaneously administered agents, mepolizumab and benralizumab*, Expert Review of Respiratory Medicine, 14.4, 2020, s. 353-365.



13. Katsoulis K., Kipourou M., Loukides S., *Reduction/elimination of blood eosinophils in severe asthma: should there be a safety consideration?*, Expert Opinion on Biological Therapy, 22, 3, 2022, s. 377-384.
14. Szymańska B., Chrzęstek A., Piwowar A., *Interleukina 13 jako immunomodulator w różnych stanach chorobowych*, Postępy Biologii Komórki, t. 47, 1(59-8), 2020
15. Efren L.R., Lockey R., *Interleukin-13 signaling and its role in asthma*, World Allergy Organization Journal, 4.3, 2011, s. 54-64.
16. Wills-Karp M., *Interleukin-13: central mediator of allergic asthma*, Science, 282.5397, 1998, s. 2258-2261.
17. Corren J., *Role of interleukin-13 in asthma*, Current allergy and asthma reports, 13.5, 2013, s. 415-420.
18. Lasek W., *Perspektywy immunoterapii chorób alergicznych I. Terapia przeciwciałami monoklonalnymi*, Alergoprofil, t. 3, 2007, s. 2-7.
19. Jahnz-Różyk K., *Analiza wpływu na budżet zmian w opisie programu lekowego B.44 – leczenie astmy ciężkiej. Wpływ zniesienia ograniczeń możliwości leczenia w programie lekowym na budżet płatnika publicznego*, Central and Eastern European Society of Technology Assessment in Health Care, Kraków 2021.
20. Kupryś-Lipińska I., Kuna P., *Omalizumab, rekombinowane humanizowane monoklonalne przeciwciało anti-IgE – nowe kierunki badań nad zastosowaniem klinicznym leku*, Pneumonologia i Alergologia Polska, t. 77, Nr 1, 2008, s. 43-42.
21. *Nucala EPAR Summary for the public*, European Medicines Agency, 2015.
22. Markham A., *Benralizumab: First Global Approval*, Drugs, 78, 2018, s. 505-511.
23. Poddighe D., Vangelista L., *Effects of omalizumab on basophils: Potential biomarkers in asthma and chronic spontaneous urticaria*, Cellular Immunology, t. 358, 2020.
24. Przemęcka M., Kuna P., *Omalizumab – program leczenia przewlekłej spontanicznej pokrzywki*, W gabinecie lekarza rodzinnego, Terapia, t. 12, 2020, s. 35-38.
25. Sposato B., Scalese M., Milanese M., Masieri S., Cavaliere C., Latorre M., Scichilone N., Matucci A., Vultaggio A., Ricci A., Cresti A., Santus P., Perrella A., Paggiaro P.L., *Factors reducing omalizumab response in severe asthma*, European Journal of Internal Medicine, t. 52, 2018, s. 78-85.
26. *Raport Astma Ciężka. Sytuacja Pacjentów w Polsce*, Polska Federacja Stowarzyszeń Chorych na Astmę, Alergię i POChP, <https://www.astma-alergia-pochp.pl> [data dostępu: październik 2021].
27. Pelaia G., Gallelli L., Renda T., Romeo P., Busceti M.T., Grembiale R.D., Maselli R., Marsico S.A., Vatrella A., *Update on optimal use of omalizumab in management of asthma*, Journal of asthma and allergy, t. 4, 2011, s. 49-59.
28. Jakubiak G.K., *Antagoniści interleukiny 5 – nowa grupa leków w farmakoterapii astmy*, Lek w Polsce, t. 26, 2016, s. 34-40.
29. Hermanowicz-Salamon J., *Miejsce terapii anti-IL-5 w leczeniu astmy ciężkiej*, Pneumonologia Terapia, 2020, s. 26-31.
30. Pelaia C., Vatrella A., Bruni A., Terracciano R., Pelaia G., *Benralizumab in the treatment of severe asthma: design, development and potential place in therapy*, Drug Design, Development and Therapy 2018, tom 12, s. 619-628.
31. Ghazi A., Trikha A., Calhoun W.J., *Benralizumab – a humanized mAb to IL-5Ra with enhanced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity – a novel approach for the treatment of asthma*, Expert Opinion on Biological Therapy 2012.
32. González D.I., Benítez M.F., Quirce S., *Benralizumab: A New Approach for the Treatment of Severe Eosinophilic Asthma*, Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology, 29(2), 2019, s. 84-93.
33. Koćwin M., Kuna P., *Dupilumab – nowy lek biologiczny do leczenia astmy i atopowego zapalenia skóry*, Alergologia Terapia, t. 4, 2020, s. 76-82.

34. Harb H., Chatila T.A., *Mechanisms of dupilumab*, Clinical & Experimental Allergy, t. 50, 2020, s. 5-14.
35. Castro M., Mathur S., Hargreave F., Boulet L.P., Xie F., Young J., Wilkins H.J., Henkel T., *Reslizumab for poorly controlled, eosinophilic asthma: a randomized, placebo-controlled study*, American journal of respiratory and critical care medicine, t. 184, 2011, s.1125-1132.
36. Rogala B., Maciej Kupczyk M., Bochenek G., Śliwiński P., Moniuszko M., Glück J., Dobek R., Kulus M., *Terapia biologiczna astmy-stanowisko Polskiego Towarzystwa Alergologicznego (PTA) i Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc (PTChP)*, Alergologia Polska, 2020.
37. *Leczenie ciężkiej astmy alergicznej IgE zależnej oraz ciężkiej astmy eozynofilowej*, <https://www.gov.pl/web/zdrowie/choroby-nieonkologiczne> [data dostępu: październik 2021].
38. Lista ośrodków zajmujących się leczeniem astmy ciężkiej, <https://www.mp.pl/pacjent/astma/astma-ciezka/mapa> [data dostępu: październik 2021]
39. Kupryś-Lipińska I., Pałczyński C., Kowalczyk M., Kuna P., *Jakie zmiany przyniosła nowa GINA 2020?*, Alergologia Terapią, 4, 2020, s. 4-11
40. Rogliani P., Calzetta L., Matera M.G., Laitano R., Ritondo B.L., Hanania N.A., Cazzola M., *Severe Asthma and Biological Therapy: When, Which, and for Whom*, Pulmonary Therapy, t. 6, 2020, s. 47-66.
41. Wniosek o objęcie refundacją leku Dupixent (dupilumab) w ramach programu lekowego: *Leczenie ciężkiej astmy z zapaleniem typu 2 dupilumabem (ICD-10 J45, J82) Analiza weryfikacyjna* [data dostępu: październik 2021].

Przeciwciała monoklonalne – leczenie biologiczne w terapii ciężkiej astmy oskrzelowej w Polsce

Streszczenie

Celem pracy jest przedstawienie aktualnych możliwości podjęcia terapii lekami biologicznymi, procesu kwalifikowania do refundowanego leczenia biologicznego astmy ciężkiej w ramach programu lekowego B.44. w Polsce oraz ocena jego dostępności. Praca opisuje również mechanizmy działania leków biologicznych w leczeniu ciężkiej astmy oskrzelowej na podstawie dostępnego piśmiennictwa. Polscy pacjenci mogą bezpłatnie korzystać z najnowocześniejszych terapii biologicznych dostępnych w ramach programu lekowego, który od listopada 2017 roku funkcjonuje pod nazwą „Leczenie ciężkiej astmy alergicznej IgE-zależnej oraz ciężkiej astmy eozynofilowej”. Międzynarodowe standardy diagnostyki i leczenia wskazują, że w astmie ciężkiej leczeniem pierwszego wyboru po nieskutecznym leczeniu wziewnym powinny być właśnie leki biologiczne, a nie stosowane wcześniej GKS systemowe, które wiążą się ze zwiększonym ryzykiem skutków ubocznych. Do leczenia biologicznego w ciężkiej astmie w ramach programu lekowego w Polsce kwalifikuje się po diagnostyce różnicowej według najnowszych wytycznych GINA. Modelowy pacjent kwalifikujący się do leczenia jest niepalący, stosuje dotychczas GKS wziewne w dawce >1000 µg oraz drugi lek kontrolujący. Wyróżnia się dwa fenotypy astmy kwalifikujące do leczenia biologicznego: ciężką astmę alergiczną IgE zależną oraz ciężką astmę eozynofilową. W ramach programu lekowego pacjentów ze stwierdzoną ciężką astmą alergiczną IgE zależną leczy się omalizumabem, natomiast w przypadku ciężkiej astmy eozynofilowej podaje się mepolizumab lub benralizumab. Przeciwwskazaniami do włączenia do programu lekowego są: nadwrażliwość na omalizumab, mepolizumab, benralizumab lub substancje pomocnicze, występowanie chorób współistniejących powodujących ciężki przebieg astmy, ciąży i karmienie piersią, jednoczesna terapia lekami immunosupresyjnymi, przeciwnowotworowymi, wlewami z immunoglobulin lub innymi lekami biologicznymi lub przyjmowanie innych leków biologicznych w leczeniu astmy (np. mepolizumabu, benralizumabu) – do 3 miesięcy od zakończenia terapii. Terapia biologiczna ma wysoki profil bezpieczeństwa oraz daje perspektywę na długotrwałe lub całkowite ustąpienie objawów astmy. W przyszłości możliwe jest włączenie do programu lekowego nowych preparatów, takich jak reslizumab bądź dupilumab. Ten ostatni uzyskał już pozytywną rekomendację Prezesa Agencji Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji dotyczącą jego refundacji i włączenia do programu B.44. Dodatkowe zwiększenie dostępności zapewni wprowadzenie zmian dotyczących czasu leczenia, okresu wash-out oraz stosowaniu terapii biologicznej astmy równocześnie z innymi lekami biologicznymi, przeciwnowotworowymi i wlewami z immunoglobulin.

Słowa kluczowe: leczenie biologiczne astmy, mepolizumab, benralizumab, omalizumab, przeciwciała monoklonalne



Monoclonal antibodies – biological treatment in the treatment of severe bronchial asthma in Poland

Abstract

This paper aims to present the current means of undertaking the biological medicine therapy, the process of qualification for a refund of severe asthma biological treatment within the medicine programme B.44 in Poland and to assess its availability. This paper also describes the medicine's mechanisms of curing severe bronchial asthma based on available works. Polish patients can access modern biological therapies free of charge thanks to the medicine programme known since November 2017 as „Treating severe IgE-dependent allergic asthma and eosinophilic severe asthma”. International diagnostics and treatment standards prove that, in case of severe asthma, after ineffective inhalation treatment, biological medicine ought to be the first choice of treatment instead of (utilized in the past) systemic glucocorticosteroids, which result in increased ratio of side effects. A differential diagnosis in accord with the latest GINA guidelines qualifies for a biological treatment via medicine programme in Poland. A model patient who qualifies for the treatment is a non-smoker, and takes inhalable glucocorticosteroids doses over 1000 µg, as well as the second control medicine. Two asthma phenotypes qualify for a biological treatment: severe allergic IgE-dependent asthma and severe eosinophile asthma. Within the aforementioned medicine programme, patients with confirmed severe IgE-dependent allergic asthma are treated with omalizumab, and those with confirmed severe eosinophile asthma are treated with mepolizumab or benralizumab. Contraindications for joining the medicine programme are: hypersensitivity for omalizumab, mepolizumab or benralizumab or auxiliary substances, comorbidities causing severe course of asthma, pregnancy and breastfeeding, simultaneous immuno-suppressives or antitumour treatment, immunoglobuline infusion or other biological medicine, as well as taking other biological asthma medicine (i.e. mepolizumab or benralizumab) – up to 3 months since finishing therapy. Biological treatment is highly secure and enables prospects for long-term or entire withdrawal of asthma symptoms. In the future inclusion of the new medicines to the programme, like reslizumab or dupilumab remains in the realm of possibility. The latter has been already greenlit by the Head of the Medical Technology Rating and Tariffication Agency for refund and inclusion to the B.44 programme. Additional increase in availability will ensure changes in therapy length, the wash-out period and application of the biological therapy in accord with other biological and antitumour medicines, as well as immunoglobuline infusions.

Keywords: biological treatment of asthma, mepolizumab, benralizumab, omalizumab, monoclonal antibodies

Niezmiennie limfocyty T związane z błoną śluzową – MAIT (*mucosal associated invariant T cells*) – udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej

1. Wprowadzenie

Niezmiennie komórki T związane z błoną śluzową (ang. *mucosal associated invariant T cells*, MAIT) są definiowane przez ekspresję receptora TCR $\alpha\beta$. TCR jest zbudowany z dwóch łańcuchów α , β lub γ i δ , zawierających część zmienną, w której wyróżniamy regiony hiperzmienne, czyli regiony determinujące dopasowanie (CDR) oraz część stałą. Komórki MAIT rozpoznają również antygeny prezentowane w kompleksie z białkiem MHC-Ib, jakim jest MR1 [1, 2, 3].

Najwięcej komórek MAIT występuje w wątrobie [4-6]. Ponadto występują również m.in. w błonie śluzowej jamy ustnej, w drogach oddechowych, jelitach i skórze. W mniejszym stopniu komórki MAIT śluzówki znajdują się w błonie podstawnej i zasiedlają nabłonek. Ich główną rolą jest szybka reakcja na patogeny oraz ochrona przed uszkodzeniami tkanek [5].

2. Fenotyp komórek MAIT

U ludzi komórki MAIT to głównie komórki CD8⁺. Komórki MAIT wyrażają głównie homodimery CD8 $\alpha\alpha$ lub mają niski poziom CD8 $\alpha\beta$, w przeciwieństwie do konwencjonalnych populacji komórek T, które są głównie CD8 $\alpha\beta$ ⁺. Ludzkie komórki MAIT wykazują fenotyp pamięci komórkowej i charakterystyczną ekspresję m.in. kilku cząsteczek powierzchniowych tj. CD27, CD25, CD69, receptorów cytokin i chemokin (np. IL-12, IL-18, CCR6, CCR5) oraz czynników transkrypcyjnych (PLZF, ROR- γ T, T-bet) [7].

3. Aktywacja komórki MAIT

Komórki MAIT mogą być aktywowane za pośrednictwem MR1 lub poprzez mechanizmy niezależne od MR1. MR1 jest niepolimorficzną cząsteczką, związaną z β 2-mikroglobuliną prezentującą antygen. Jakie komórki wykazują ekspresję MR1?

MR1 znajduje się w retikulum endoplazmatycznym, gdzie są transportowane metabolity ryboflawiny. Wówczas dochodzi do wiązania półproduktów ryboflawiny poprzez tworzenie zasady Shiffa, całkowite fałdowanie oraz asocjację z β 2-mikroglobuliną. Kompleks wędruje do błony komórkowej, a większość cząsteczek MR1 ulega degradacji

¹ domi.blazkowska@gmail.com Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Immunologii i Serologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

² patka596@gmail.com Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Immunologii i Serologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

³ klaudiacz25188@wp.pl Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Immunologii i Serologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.

⁴ ola.czarnecka@op.pl Studenckie Koło Naukowe przy Katedrze i Zakładzie Immunologii i Serologii, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach.



i reinternalizacji wewnątrzkomórkowej. Taki szlak zapewnia prezentację antygenów ryboflawiny przez MR1 oraz aktywację komórek MAIT. Do pełnej aktywacji jednak wymagają sygnałów kostymulacji m.in. przez CD28, agonistów TLR (ang. *Toll-like receptors*), produkty bakteryjne lub cytokiny (IL-7, TNF), IFN typu I, IL-1 β i/lub IL-23) [3].

Komórki MAIT mogą być również aktywowane przez cytokiny. Ponadto są zdolne do rekrutacji neutrofilii, promowania produkcji IFN- γ przez komórki dendrytyczne (ang. *Dendritic Cells*, DC) oraz zwiększają aktywność bakteriobójczą fagocytów [3].

4. Rola komórek MAIT w zakażeniach

W 2015 roku Napier R.J., i wsp. [7] opracowali model na podstawie badań na myszach, który przedstawia rolę komórek MAIT w przebiegu infekcji bakteryjnej:

- komórki MAIT pochodzące z grasicy posiadają wrodzoną zdolność efektorową, a ze względu na ich lokalizację w określonych miejscach błon śluzowych, mogą służyć jako wczesne detektory zakażenia bakteryjnego bądź grzybiczego;
- komórka dendrytyczna (lub inna komórka wyrażająca ekspresję MR1) prezentuje antygen bakteryjny poprzez MR1 komórkom MAIT-posiadającym łańcuch TCR;
- komórki MAIT aktywowane w sposób MR1-zależny mogą w dalszej kolejności ulegać klonalnej ekspansji, które są specyficzne dla danego antygeny w zainfekowanej tkance;
- komórki MAIT mogą wydzielać cząsteczki cytotoksyczne np. granzymu B i perforyn lub uwalniać cytokiny prozapalne, m.in. TNF oraz IFN- γ ;
- w sposób MR1-niezależny komórki MAIT mogą ulec aktywacji, za pośrednictwem IL-12. Aktywowane w ten sposób komórki MAIT wydzielają IFN- γ , który pobudza makrofagi [7].

Model ten sugeruje prawdopodobny udział komórek MAIT w zarówno w odporności wrodzonej, jak i nabytej [7].

4.1. Udział komórek MAIT w procesie naprawy tkanek i gojenia ran

Komórki MAIT cechuje plastyczność funkcjonalna, mająca również swoje odzwierciedlenie na poziomie genów. Zmiany transkrypcyjne występują na każdym etapie rozwojowym w grasicy, co wynika z ekspresji kluczowych czynników transkrypcyjnych: PLZF, ROR γ t, warunkując specyficzne sygnatury transkrypcyjne determinujące dystrybucję komórek MAIT w określonych miejscach ustroju [8, 9]. Na podstawie przeprowadzonych badań na modelach zwierzęcych porównujących sygnaturę transkrypcyjną komórek MAIT wykazano, że transkryptom mysich komórek MAIT aktywowany TCR, przypominał transkryptom komórek iNKT (ang. *invariant natural killer T cells*, iNKT), a po ustąpieniu zakażenia był podobny do limfocytów T $\gamma\delta$ [10]. Co istotne, limfocyty T $\gamma\delta$ stanowią populację niekonwencjonalnych limfocytów T, które przyczyniają się do utrzymania integralności i naprawy tkanek [13]. Po zależnej od TCR aktywacji komórek MAIT, obecność sygnatury naprawy tkanek ma kluczowe znaczenie na przykład w miejscowym zakażeniu *S. epidermidis* [14]. Najbardziej istotne geny w tej sygnaturze biorą udział w naprawie i przebudowie tkanek: MMP25, PDGF β , TGF β 1 oraz w angiogenezie: CSF2, VEGFB, PDGF β . Innymi czynnikami, pochodzącymi z komórek MAIT są OSM, czynnik wzrostu wiążący heparynę z EGF – HBEGF), które również odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy tkanek [12, 15].

4.2. Znaczenie komórek MAIT w odpowiedzi immunologicznej na zakażenia bakteryjne

Legionella spp. to gram-ujemne, fakultatywne, wewnątrzkomórkowe patogeny, które po zakażeniu wywołują szereg jednostek chorobowych od gorączki Pontiac do ciężko przebiegającego martwiczego zapalenia płuc – choroby legionistów [16]. W zależności od położenia geograficznego, dominującym patogenem może być *L. pneumophila* (Ameryka Południowa, Europa) bądź *L. longbeachae* (Australia, Tajlandia) [17]. *Legionella spp.* wyrażające szlak biosyntezy ryboflawiny indukują aktywację komórek MAIT w sposób MR1-zależny. W toku przeprowadzonych badań wykazano, że komórki MAIT poprzez mechanizm MR1-zależny, IFN- γ i GM-CSF przyczyniają się do ochrony przed zakażeniem *Legionella spp.* [18].

Potencjalną lokalizacją *L. longbeachae* w przebiegu infekcji są neutrofile, ale drobnoustroj ten może występować w makrofagach i komórkach dendrytycznych. Dotychczasowe badania wykazały obecność komórek MAIT w miejscu zakażenia w pobliżu zainfekowanych komórek zawierających pałeczki *Legionella* [18]. Jest to związane z rekrutacją komórek MAIT z krwi obwodowej do wrót infekcji, co zostało wykazane w badaniach związanych z udziałem komórek MAIT podczas zakażenia płuc [19-22]. *L. pneumophila* i *L. longbeachae* stymulują do różnicowania linię komórkową wyrażającą MAIT TCR, w obecności limfoidalnej linii komórkowej wyrażającej ekspresję MR1. Linie komórkowe MR1+ indukują ekspresję TNF za pośrednictwem 5-(2-oksopropylidenoamino)-6-d-rybityloaminourazomacyl (5-OP-RU) podczas prezentowania przez MHC klasy I – komórki MR1-5-OP-RU tetramer + MAIT [23]. Aktywacja ta jest specyficzna dla komórek MAIT i zależna od MR1. W obecności komórek MR1 nadekspresyjnych, komórki MAIT wykazują ekspresję IFN- γ , jednak jest ona mniejsza niż ekspresja TNF [18]. W trakcie ostrej fazy zakażenia komórki MAIT wydzielają IIL-17A, IFN- γ i GM-CSF. W trakcie infekcji oraz po jej ustąpieniu większość komórek MAIT wykazuje ekspresję IL-17A, natomiast wydzielanie IFN- γ okazało się nieznacznie mniejsze, jednakże w porównaniu z niezakażonymi komórkami – istotnie wyższe. Odwrotna sytuacja odnosi się do czynnika GM-CSF – liczba komórek MAIT wykazujących ekspresję GM-CSF jest najwyższa po ustąpieniu zakażenia, a najniższa w fazie ostrej [18].

Francisella tularensis jest Gram-ujemną, nieprzetrwalnikującą bakterią wewnątrzkomórkową i przyczynia się do chorób układu oddechowego, tularemii oraz rzadkiej, ale śmiertelnej infekcji ogólnoustrojowej. Do zakażenia może dojść drogą oddechową, w wyniku spożycia skażonej wody bądź podczas ukłucia kleszcza [24]. Komórki MAIT podczas zakażenia *F. tularensis* reagują głównie poprzez wydzielanie cytokin m.in. TNF, IFN- γ [25]. Poza tym, kluczowe znaczenie w kontroli infekcji polegało na tworzeniu populacji komórek pamięci, które tak jak w przypadku zakażenia *L. longbeachae* wykazywały zmieniony transkryptom i fenotyp. W przeprowadzonych badaniach, na podstawie oceny podwyższonej ekspresji CD69 na powierzchni komórek MAIT, wykazano stymulację tych limfocytów zarówno w supernatantach hodowli *F. tularensis*, jak i w lizatach bakteryjnych. Aktywacja komórek MAIT w przypadku zakażenia *F. tularensis* jest MR1-zależna. Komórki MAIT w odpowiedzi na zakażenie *in vivo* kumulują się w narządach takich jak wątroba, płuca, śledziona, nerki oraz we krwi po 2 tygodniach od zakażenia [25]. Ponadto, niezależnie od drogi zakażenia, patogen ten rozprzestrzenia się ogólnoustrojowo, co sprzyja również ekspansji komórek



MAIT w zainfekowanych miejscach. Podczas ostrej fazy infekcji stwierdza się największą liczbę komórek wytwarzających TNF, IFN- γ i GM-CSF oraz niewielki odsetek komórek produkujących IL-17. Odsetek komórek MAIT wytwarzających GM-CSF zwiększa się we wszystkich narządach, z wyjątkiem nerek [25]. W płucach i wątrobie zmniejsza się odsetek komórek MAIT wytwarzających IL-17, który później ulega zwiększeniu tylko w płucach [25].

Co istotne, komórki MAIT oznaczają się zmienionymi transkryptomami uzyskanymi przez ich aktywację po infekcji. Mają one tendencję do wyrażania czynników transkrypcyjnych m.in. TBX21, T-bet) oraz IFN- γ wówczas są to komórki MAIT-1 [25]. Natomiast MAIT-17 wyrażają ekspresję ROR γ t i IL-17A [25].

Ostatnie badania wykazały istotne znaczenie komórek MAIT po stymulacji *Salmonella enterica serovar Typhi*, będącej czynnikiem etiologicznym duru brzuszego [26]. Bakteria ta przyczynia się do aktywacji komórek MAIT, ich proliferacji oraz rekrutacji do miejsca rozwijającej się infekcji. Wykazano wyższy odsetek aktywowanych komórek MAIT (CD38) posiadających markery CCR6 i CCR9 u osób z niższą dawką inokulum *S. Typhi* w porównaniu do osób, które otrzymały wyższą dawkę inokulum. Niewiele jednak wiadomo o działaniach stymulujących komórki MAIT do tkanek objętych zakażeniem oraz wpływu dawki infekcyjnej na zdolność rekrutacji. Stymulacja za pomocą *S. Typhi*, niezależnie od dawki, powoduje aktywację komórek MAIT CD38+ lub CD38+ HLA-DR+. Wysoki odsetek komórek MAIT CD38+ lub CD38+ HLA-DR+ jest związany ze spadkiem liczby tych komórek w obiegu, czego skutkiem najprawdopodobniej jest rekrutacja do miejsc zainfekowanych [26].

5. Rola komórek MAIT w wybranych zespołach klinicznych

5.1. Komórki MAIT w cukrzycy typu 1

U dzieci z cukrzycą typu 1 o późnym początku wykazano, że odsetek komórek MAIT jest zmniejszony w porównaniu do odsetka tych komórek u dzieci z utrwaloną cukrzycą i dzieci zdrowych [27]. W cukrzycy typu 1 [T1D], komórki MAIT obecne we krwi, wykazują mniejszą ekspresję CCR6, co wskazuje na zwiększenie rekrutacji tkanekowej, a ponadto wykazują one wyższy poziom CD25 i PD-1 oraz obniżony poziom antyapoptotycznego BCL-2, sugerując ich zmniejszoną odporność na apoptozę. Za pomocą PMA-jonomycyny po stymulacji *in vitro*, u dzieci o późnym początku T1D komórki MAIT z krwi charakteryzują się mniejszą produkcją IFN- γ , a większą TNF- α , granzymu B i IL-17 w porównaniu z komórkami MAIT u dzieci z grupy kontrolnej i dzieci z utrwaloną T1D. Komórki MAIT są w takim przypadku również słabiej aktywowane przez bezpośrednią stymulację TCR. Ponadto, komórki MAIT u dzieci z utrwaloną cukrzycą typu 1 posiadają fenotyp pośredni pomiędzy komórkami występującymi u dzieci z początkową T1D i u dzieci z grupy kontrolnej, zarówno pod względem markerów powierzchniowych, jak i produkcji cząsteczek [27]. Trzustkowe komórki MAIT mogą bezpośrednio brać udział w patofizjologii cukrzycy typu 1 i destrukcji komórek β trzustki – częstość występowania komórek MAIT wydzielających granzym B jest dodatnio skorelowana z poziomem hemoglobiny glikowanej, sugerując zwiększoną ich aktywność w trakcie ostrego rozwoju T1D. Co więcej, produkcja IFN- γ i TNF przez komórki MAIT sprzyja indukcji ekspresji kompleksu MR1 na liniach komórkowych β trzustki. Także, w doświadczeniach z kohodowlami komórek MAIT wykazano, że są zdolne do bezpośredniego zabijania *in vitro* poprzez degranulację komórek β trzustki. [27].

5.2. Komórki MAIT w patogenezie cukrzycy typu 2 oraz otyłości

Funkcjonalna rola komórek MAIT jest silnie zaburzona u pacjentów z T2D (cukrzycą typu 2) oraz u pacjentów otyłych – zmniejszeniu ulega ich odsetek u pacjentów z T2D i pacjentów z otyłością w porównaniu do osób zdrowych. Co ciekawe, komórki MAIT są niewykrywalne u niektórych pacjentów otyłych. Wykazano również, że częstość występowania komórek MAIT jest ujemnie skorelowana z BMI i wrażliwością tkanek na insulinę. Ponadto, komórki MAIT wykazują główny aktywowany fenotyp prozapalny Th17 oraz po stymulacji wytwarzają granzym B, IL-17 i TNF w cukrzycy typu 2, natomiast u pacjentów otyłych tylko IL-17 w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej [28, 29].

Dodatkowo u pacjentów otyłych w tkance tłuszczowej, komórki MAIT charakteryzują się większą produkcją IL-17 niż u osób zdrowych [28, 29]. Z drugiej strony, komórki te produkują mniejsze ilości IL-10 we krwi, jak i w tkance tłuszczowej [29]. W tkance tłuszczowej osób otyłych stwierdzono zwiększoną częstość występowania komórek Ki-67 MAIT, wykazujących zmniejszoną ekspresję białek antyapoptotycznych BCL-2 [28].

Czynniki takie jak nadwaga czy otyłość mogą sprzyjać procesowi zwiększonej rekrutacji komórek MAIT z krwi do tkanki tłuszczowej [28, 29].

5.3. Toczeń rumieniowaty układowy

Wyniki ostatnich badań sugerują, że odsetek komórek MAIT jest zmniejszony, a ich aktywacja jest skorelowana z aktywnością choroby u osób cierpiących na SLE, co wynika ze słabej odpowiedzi tych komórek na aktywację, jak i również podwyższoną ekspresję białka PD-1. Do nieprawidłowej funkcji komórek MAIT przyczyniać się może także niedobór komórek iNKT [30, 31]. W wyniku silnego stanu zapalnego podwyższone stężenia niektórych cytokin korelują z aktywacją komórek MAIT w SLE w konsekwencji stymulacji CD69 na tych komórkach. U osób chorych na SLE ekspresja CD69 występujących na komórkach MAIT koreluje ze stężeniem IL-6, IL-18 i IFN- α w osoczu [31,32].

5.4. Stwardnienie rozsiane

Rola komórek MAIT w patogenezie stwardnienia rozsianego (ang. *multiple sclerosis*, MS) wzbudza kontrowersje [33]. Zaobserwowano zmniejszoną ilość tych komórek we krwi obwodowej chorych na stwardnienie rozsiane, a także stwierdzono ich obecność w zmianach chorobowych w mózgu [32, 34-37]. Badania, które prowadzone były na modelu mysim EAE (ang. *Experimental Autoimmune Encephalitis*) wskazują na ich rolę regulacyjną [38]. Niemniej jednak zdolność komórek MAIT do produkcji IL-17 oraz innych cytokin prozapalnych, a także skłonności do powodowania lizy komórek docelowych w warunkach *in vitro* sugerują, że mają one funkcję w nasileniu i progresji choroby [39]. Komórki MAIT i cząsteczka MR1, zostały wykryte w zmianach w przebiegu stwardnienia rozsianego w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów z MS [34, 36, 40]. Na podstawie badań wykazano, że w przypadku pacjentów z MS występuje większe różnicowanie komórek MAIT o fenotypie typu 17 niż u osób zdrowych, a analiza odpowiedzi tych komórek na IL-7 oraz ekspresji powierzchniowej receptora IL-7 pozwoliła stwierdzić, że istnieje funkcjonalny związek między sygnalizacją IL-7 a zwiększoną produkcją IL-17 przez komórki MAIT w przebiegu MS [39].

Wśród komórek MAIT pochodzących od pacjentów chorych na stwardnienie rozsiane wykazano zwiększoną liczbę komórek IL-17+, jak również znacznie wyższą ekspresję ROR γ t i receptora CCR6, podczas gdy markery aktywacji komórek T CD38 i HLA-DR nie różniły się między sobą. Funkcjonalny związek sygnalizacji IL-7 i różnicowania typu 17 komórek MAIT *in vivo* sprawia, że komórki MAIT są bardziej patogenne u pacjentów z MS ze względu na zwiększoną ekspresję IL-7R [39]. Ponieważ sygnalizacja IL-7R jest niezbędna dla homeostazy komórek T, szczególnie w komórkach T pamięci, zwiększona ekspresja IL-7R przez MAIT u pacjentów z MS może mieć również inne konsekwencje w funkcjonowaniu niż zwiększone różnicowanie typu 17 [41]. Co więcej, komórki MAIT są zdolne do produkcji GM-CSF, który pełni rolę w mechanizmie powstawania stwardnienia rozsianego, a w przypadku komórek T CD4+ wykazano, że sygnalizacja STAT-5 po ekspozycji na IL-7 lub IL-2 indukuje produkcję GM-CSF [42-45].

5.5. Astma

Na temat roli komórek MAIT w patogenezie tej choroby niewiele wiadomo, jednak badania wykazały zmniejszenie ich odsetka we krwi, płwocinie i próbkach z biopsji u pacjentów, co było związane z ciężkością astmy [46]. Stwierdzono dodatnią korelację między ilością komórek MAIT a wydzielaniem cytokin przez komórki T CD4+, w szczególności z ich zdolnością do wytwarzania IFN- γ i ujemną korelację w przypadku komórek T CD4+ produkujących IL-4 [47]. Na podstawie prowadzonych badań wywnioskowano, że duży odsetek krążących komórek MAIT u dzieci jednorocznych przekłada się na mniejsze ryzyko rozwoju astmy u tych dzieci w wieku około 7 lat, a możliwy efekt ochronny sugeruje korelacja podwyższonego odsetka komórek MAIT z odsetkiem komórek T CD4+ produkujących IFN- γ [47]. W przypadku badań obejmujących dzieci z łagodną astmą stwierdzono, że ilość krążących komórek MAIT nie różniła się w przypadku osób z zaostrzeniami i bez zaostrzeń [48].

6. Podsumowanie

Pomimo przeprowadzonych dotychczas licznych badań, wciąż interesujące wydaje się poznanie roli komórek MAIT. Komórki te odgrywają istotną rolę zarówno w przebiegu zakażeń jak również w procesie naprawy i gojenia się ran. Ponadto, udowodniono, że uczestniczą w patogenezie wybranych zespołów klinicznych.

Literatura

1. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T., *Immunologia*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2007.
2. Tilloy F., Treiner E., Park S. H., Garcia C., Lemonnier F., De La Salle H., Bendelac A., Bonneville M., Lantz O., *An invariant T cell receptor α chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted $\alpha\beta$ T cell subpopulation in mammals*, *The Journal of experimental medicine*, 1999, s. 1907-1921.
3. Hinks T.S., Zhang X.W., *MAIT cell activation and functions*, *Frontiers in immunology*, 2020, s. 1014.
4. Huang S., Gilfillan S., Cella M., Miley M.J., Lantz O., Lybarger L., Fremont D.H., Hansen T.H., *Evidence for MRI antigen presentation to mucosal-associated invariant T cells*, *Journal of Biological Chemistry*, 2005, s. 21183-21193.
5. Nel I., Bertrand L., Toubal A., Lehuen A., *MAIT cells, guardians of skin and mucosa?*, *Mucosal immunology*, 2021, s. 803-814.

6. Dusseaux M., Martin E., Serriari N., Péguillet I., Premel V., Milder M., Le Bourhis L., Soudais C., Treiner E., Louis D., Lantz O., *Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells*, The Journal of the American Society of Hematology, 2011, s. 1250-1259.
7. Legoux F., Gilet J., Procopio E., Echasserieau K., Bernardeau K., Lantz O., *Molecular mechanisms of lineage decisions in metabolite-specific T cells*, Nature immunology, 2019, s. 1244-1255.
8. Godfrey D.I., Koay H.F., McCluskey J., Gherardin N.A., *The biology and functional importance of MAIT cells*, Nature immunology, 2019, s. 1110-1128.
9. Hinks T.S., Marchi E., Jabeen M., Olshansky M., Kurioka A., Pediongco T.J., Meehan B.S., Kostenko L., Turner S.J., Corbett A.J., Chen Z., Klenerman P., McCluskey J., *Activation and in vivo evolution of the MAIT cell transcriptome in mice and humans reveals tissue repair functionality*, Cell reports, 2019, s. 3249-3262.
10. Leng T., Akther H.D., Hackstein C.P., Powell K., King T., Friedrich M., Christoforidou Z., McCuaig S., Neyazi M., Arancibia-Carcamo C.V., Hagel J., Powrie F., Oxford IBD Investigators, Peres R.S., Millar V., Ebner D., Lamichhane R., Ussher J., Hinks T.S.C., Marchi E., Willberg C., Klenerman P., *TCR and inflammatory signals tune human MAIT cells to exert specific tissue repair and effector functions*, Cell reports, 2019, s. 3077-3091.
11. Lamichhane R., Schneider M., De la Harpe S.M., Harrop T.W.R., Hannaway R.F., Dearden P.K., Kirman J.R., Tyndall J.D.A., Vernall A.J., Ussher J.E., *TCR-or cytokine-activated CD8+ mucosal-associated invariant T cells are rapid polyfunctional effectors that can coordinate immune responses*, Cell reports, 2019, s. 3061-3076.
12. Nielsen M.M., Witherden D.A., Havran W.L., *$\gamma\delta$ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues*, Nature Reviews Immunology, 2017, s. 733-745.
13. Legoux F., Bellet D., Daviaud C., El Morr Y., Darbois A., Niort K., Procopio E., Salou M., Gilet J., Ryffel B., Balvay A., Foussier A., Sarkis M., El Marjou A., Schmidt F., Rabot S., Lantz O., *Microbial metabolites control the thymic development of mucosal-associated invariant T cells*, Science, 2019, s. 494-499.
14. Leng T., Akther H.D., Hackstein C.P., Powell K., King T., Friedrich M., Christoforidou Z., McCuaig S., Neyazi M., Arancibia-Carcamo C.V., Hagel J., Powrie F., Oxford IBD Investigators, Peres R.S., Millar V., Ebner D., Lamichhane R., Ussher J., Hinks T.S.C., Marchi E., Willberg C., Klenerman P., *TCR and inflammatory signals tune human MAIT cells to exert specific tissue repair and effector functions*, Cell reports, 2019, s. 3077-3091.
15. Winn W.C.Jr. Myerowitz R.L., *The pathology of the Legionella pneumonias: A review of 74 cases and the literature*, Human Pathology, 1981, s. 401-422.
16. Garrison L.E., Kunz J.M., Cooley L.A., Moore M.R., Lucas C., Schrag S., Sarisky J., Whitney C.G., *Vital signs: deficiencies in environmental control identified in outbreaks of Legionnaires' disease-North America, 2000-2014*, American Journal of Transplantation, 2016, s. 3049-3058.
17. Wang H., D'Souza C., Lim X.Y., Kostenko L., Pediongco T.J., Eckle S.B., Meehan B.S., Shi M., Wang N., Li S., Liu L., Mak J.Y., Fairlie D.P., Iwakura Y., Gunnensen J.M., Stent A.W., Godfrey D.I., Rossjohn J., Westall G.P., Kjer-Nielsen L., Strugnell R.A., McCluskey J., Corbett A.J., Hinks T.S.C., Chen Z., *MAIT cells protect against pulmonary Legionella longbeachae infection*, Nature communications 9, 2018, s. 1-15.
18. Grimaldi D., Le Bourhis L., Sauneuf B., Dechartres A., Rousseau C., Ouaz F., Milder M., Louis D., Chiche J.D., Mira J.P., Lantz O., Pène F., *Specific MAIT cell behaviour among innate-like T lymphocytes in critically ill patients with severe infections*, Intensive care medicine, 2014, s. 192-201.
19. Van Wilgenburg B., Scherwitzl I., Hutchinson E.C., Leng T., Kurioka A., Kulicke C., De Lara C., Cole S., Vasanawathana S., Limpitikul W., Malasit P., Young D., Denney L., STOP-HCV consortium, Moore M.D., Fabris P., Giordani M.T., Oo Y.H., Laidlaw S.M.,

- Dustin L.B., Ho L-P., Thompson F.M., Ramamurthy N., Mongkolsapaya J., Willberg C.B., Screaton G.R., Klenerman P., *MAIT cells are activated during human viral infections*, Nature communications, 2016, s. 1-11.
20. Jiang J., Wang X., An H., Yang B., Cao Z., Liu Y., Su J., Zhai F., Wang R., Zhang G., Cheng X., *Mucosal-associated invariant T-cell function is modulated by programmed death-1 signaling in patients with active tuberculosis*, American journal of respiratory and critical care medicine, 2014, s. 329-339.
21. Loh L., Wang Z., Sant S., Koutsakos M., Jegaskanda S., Corbett A.J., Liu L., Fairlie D.P., Crowe J., Rossjohn J., Xu J., Doherty P.C., McCluskey J., Kedzierska K., *Human mucosal-associated invariant T cells contribute to antiviral influenza immunity via IL-18-dependent activation*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, s. 10133-10138.
22. Kjer-Nielsen L., Patel O., Corbett A.J., Le Nours J., Meehan B., Liu L., Bhati M., Chen Z., Kostenko L., Reantragoon R., Williamson N.A., Purcell A.W., Dudek N.L., McConville M.J., O'Hair R.A.J., Khairallah G.N., Godfrey D.I., Fairlie D.P., Rossjohn J., McCluskey J., *MRI presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells*, Nature, 2012, s. 717-723.
23. Ohtake S., Martin R.A., Saxena A., Lechuga-ballesteros D., Santiago A.E., Barry E.M., Truong-Le V., *Formulation and stabilization of Francisella tularensis live vaccine strain*, Journal of pharmaceutical sciences, 2011, s. 3076-3087.
24. Zhao Z., Wang H., Shi M., Zhu T., Pediongo T., Lim X. Y., Meehan B.S., Nelson A.G., Fairlie D.P., Mak J.Y.W., Eckle S.B.G., De Lima Moreira M., Tumpach C., Bramhall M., Williams C.G., Lee H.J., Haque A., Evrard M., Rossjohn J., McCluskey J., Corbett A.J., Chen Z., *Francisella tularensis induces Th1 like MAIT cells conferring protection against systemic and local infection*, Nature communications, 2021, s. 1-15.
25. Salerno-Goncalves R., Luo D., Fresnay S., Magder L. Darton T.C., Jones C., Waddington C.S., Blohmke C.J., Angus B., Levine M.M., Pollard A.J., Sztein M.B., *Challenge of humans with wild-type Salmonella enterica serovar Typhi elicits changes in the activation and homing characteristics of mucosal-associated invariant T cells*, Frontiers in immunology, 2017, 398.
26. Rouxel O., Da Silva J., Beaudoin L., Nel I., Tard C., Cagninacci L., Kiaf B., Oshima M., Diedisheim M., Salou M., Corbett A., Rossjohn J., McCluskey J., Scharfmann R., Battaglia M., Polak M., Lantz O., Beltrand J., Lehuen A., *Cytotoxic and regulatory roles of mucosal-associated invariant T cells in type 1 diabetes*, Nature immunology, 2017, s. 1321-1331.
27. Magalhaes I., Pingris K., Poitou C., Bessoles S., Venteclef N., Kiaf B., Beaudoin L., Da Silva J., Allatif O., Rossjohn J., Kjer-Nielsen L., McCluskey J., Ledoux S., Genser L., Torcivia A., Soudais C., Lantz O., Boitard C., Aron-Wisnewsky J., Larger E., Clement K., Lehuen A., *Mucosal-associated invariant T cell alterations in obese and type 2 diabetic patients*, The Journal of clinical investigation, 2015, s. 1752-1762.
28. Carolan E., Tobin L.M., Mangan B.A., Corrigan M., Gaoatswe G., Byrne G., Geoghegan J., Cody D., O'Connell J., Winter D.C., Doherty D.G., Lynch L., O'Shea D., Hogan A.E., *Altered distribution and increased IL-17 production by mucosal-associated invariant T cells in adult and childhood obesity*, The Journal of Immunology, 2015, s. 5775-5780.
29. Cho Y.N., Kee S.J., Kim T.J., Jin H.M., Kim M.J., Jung H.J., Park K.J., Lee S.J., Lee S.S., Kwon Y.S., Kee H.J., Kim N., Park Y.W., *Mucosal-associated invariant T cell deficiency in systemic lupus erythematosus*, The Journal of Immunology, 2014, s. 3891-3901.
30. Chiba A., Tamura N., Yoshikiyo K., Murayama G., Kitagaichi M., Yamaji K., Takasaki Y., Miyake S., *Activation status of mucosal-associated invariant T cells reflects disease activity and pathology of systemic lupus erythematosus*, Arthritis research & therapy, 2017, s. 1-10.

31. Miyazaki Y., Miyake S., Chiba A., Lantz O., Yamamura T., *Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis*, International immunology, 2011, s. 529-535.
32. Treiner E., Liblau R.S., *Mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis: the injury is still out*, Front. Immunol., 6, 2015, s. 503.
33. Ille's Z., Shimamura M., Newcombe J., Oka N., Yamamura T., *Accumulation of Valpha7.2-Jalpha33 invariant T cells in human autoimmune inflammatory lesions in the nervous system*, International Immunology, 16, 2004, s. 223-230.
34. Annibaldi V., Ristori G., Angelini D.F., Serafini B., Mechelli R., Cannoni S., Romano S., Paolillo A., Abderrahim H., Diamantini A. et al., *CD161(high) CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis*, Brain, 134, 2011, s. 542-554.
35. Willing A., Leach O. A., Ufer F., Attfield K.E., Steinbach K., Kursawe N., Piedavent M., Friese M.A., *CD8+ MAIT cells infiltrate into the CNS and alterations in their blood frequencies correlate with IL-18 serum levels in multiple sclerosis*, European Journal of Immunology, 44, 2014, s. 3119-3128.
36. Held K., Bhonsle-Deeng L., Siewert K., Sato W., Beltra'n E., Schmidt S., R uhl G., Ng J.K., Engerer P., Moser M. et al., *ab T-cells receptors from multiple sclerosis brain lesions show MAIT cells-related features*, Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation, 2, 2015, e107.
37. Croxford J.L., Miyake S., Huang Y.Y., Shimamura M., Yamamura T., *Invariant V (alpha)I9 i T cells regulate autoimmune inflammation*, Nature Immunology, 7, 2006, s. 987-994.
38. Willing A., Jager J., Reinhardt S., Kursawe N., Friese M.A., *Production of IL-17 by MAIT cells is increased in multiple sclerosis and is associated with IL-7 receptor expression*, Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950), 2018, s. 200, 974-982.
39. Abrahamsson S.V., Angelini D.F., Dubinsky A.N., Morel E., Oh U., Jones J.L. et al., *Non-myeloablative autologous haematopoietic stem cell transplantation expands regulatory cells and depletes IL-17 producing mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis*, Brain, 136, 2013, s. 2888-2903.
40. Gattinoni L., Lugli E., Ji Y., Pos Z., Paulos C.M., Quigley M.F., Almeida J.R., Gostick E., Yu Z., Carpenito C. et al., *A human memory T cells subset with stem cell-like properties*, Nature Medicine, 17, 2011, s. 1290-1297.
41. Hartmann F.J., Khademi M., Aram J., Ammann S., Kockum I., Constantinescu C., Gran B., Piehl F., Olsson T., Codarri L., Becher B., *Multiple sclerosis-associated IL2RA polymorphism controls GM-CSF production in human TH cells*, Nature Communications, 5, 2014, s. 5056.
42. Codarri L., Gy ulve'szi G., Tosevski V., Hesske L., Fontana A., Magnenat L., Suter T., Becher B., *RORgt drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation*, Nature Immunology, 12, 2011, s. 560-567.
43. Noster R., Riedel R., Mashreghi M.F., Radbruch H., Harms L., Haftmann C., Chang H.D., Radbruch A., Zielinski C.E., *IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells*, Science translation medicine, 2014, 6, 241ra80.
44. Sheng W., Yang F., Zhou Y., Yang H., Low P.Y., Kemeny D.M., Tan P., Moh A., Kaplan M.H., Zhang Y., Fu X.Y., *STAT5 programs a distinct subset of GM-CSF-producing T helper cells that is essential for autoimmune neuroinflammation*, Cell Research, 24, 2014, s. 1387-1402.
45. Hinks T.S., Zhou X., Staples K.J., Dimitroy B.D. Manta A., Petrossian T., Lum P.Y., Smith C.G., Ward J.A., Howarth P.H. et al., *Innate and adaptive T cells in asthmatic patients: relationship to severity and disease mechanism*, The Journal of Allergy and Clinical Immunology, 136, 2015, s. 323-333.
46. Chandra S., Wingender G., Greenbaum J.A., Khurana A., Gholami A.M., Ganesan A.P., Rosenbach M., Jaffee K., Gem J.E., Wood R., O'Connor G., Sandel M., Kattan M.,

- Bacharier L., Togias A., Homer A.A., Kronenberg M., *Development of asthma in inner-city children: possible roles of MAIT cells and variation in the home environment*, Journal of Immunology, 200(6), 2018, s. 1995-2003.
47. Lemzi G., Abou Taam R., Dietrich C., Chatenoud L., de Blic J., Leite-de-Moraes M., *Circulating IL-17-producing mucosal-associated invariant T cells (MAIT) are associated with symptoms in children with asthma*, Clinical Immunology, 188, 2018, s. 7-11.

Niezmiennie limfocyty T związane z błoną śluzową – MAIT (mucosal associated invariant T cells) – udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej

Streszczenie

Obecny podział limfocytów T oparty jest głównie o pełnione przez nie funkcje oraz wydzielane substancje. Jednymi z komórek, które biorą udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej organizmu, o odmiennym od innych komórek T fenotypie, są niezmiennie limfocyty T związane z błoną śluzową – komórki MAIT (*mucosal associated invariant T cells*). Występują one w największej ilości w wątrobie (10-35%), krwi (0,1-10%), a także skórze, jamie ustnej, układzie pokarmowym, oddechowym oraz moczowo-płciowym. Rolą komórek MAIT w warunkach fizjologii jest zapewnienie ochrony przed patogenami oraz aktywny udział w zwalczaniu zakażeń. Ponadto, limfocyty związane z błoną śluzową mogą sprzyjać gojeniu się ran na skórze czy naprawie tkanek, co uwarunkowane jest interakcją z mikrobiomem. W warunkach patologicznych, komórki MAIT zmieniają swój fenotyp i wytwarzają wiele cytokin, co może prowadzić do zaburzenia homeostazy organizmu. Celem tego opracowania jest analiza roli komórek MAIT w oparciu o dostępne piśmiennictwo.

Słowa klucze: niezmiennie komórki T, MAIT, fenotyp, aktywacja komórek, MR1

Mucosal associated invariant T cells (MAIT) – involved in regulation of immune response

Abstract

The current division of T lymphocytes is based mainly on their functions and secreted substances. Mucosal associated invariant T cells (MAIT cells) are one of the cells involved in the regulation of the body's immune response, with a different phenotype from other T cells. They are most abundant in the liver (10-35%), blood (0.1-10%), as well as skin, oral cavity, gastrointestinal, respiratory and genitourinary systems. The role of MAIT cells under physiological conditions is to provide protection against pathogens and actively participate in fighting infections. In addition, mucosal-associated lymphocytes may promote wound healing on the skin or tissue repair, which is determined by interaction with the microbiome. Under pathological conditions, MAIT cells alter their phenotype and produce multiple cytokines, which can lead to disruption of body homeostasis. The aim of this study is to analyze the role of MAIT cells based on available literature.

Keywords: invariant T cells, MAIT, phenotype, cell activation, MR1

Nanocząstki metali szlachetnych i ich wpływ na funkcjonowanie komórek układu nerwowego

1. Wprowadzenie

Termin „nanotechnologia” po raz pierwszy został użyty przez Richarda Feynmana w 1959 roku. Nanotechnologia jest szybko rozwijającą się dziedziną obejmującą technologie z wykorzystaniem materiałów w skali nanometrycznej [1]. Projektowane nanomateriały zdefiniowane są jako mające co najmniej jeden wymiar poniżej 100 nm, jednak w medycynie ta definicja jest elastyczna i może obejmować cząstki o większych rozmiarach np. nanoleki o cząstkach 200 nm lub większych [2].

Użycie terminu „nanocząstka” stosuje się do określenia nanosubstancji organicznych (lipidy, biopolimery) i nieorganicznych (metale, tlenki, węgiel), o różnych kształtach takich jak sześciiany, gwiazdy, igły, oraz o złożonej geometrii (w nanotechnologii DNA lub białek). Właściwości fizyczne, chemiczne oraz biologiczne nanocząstki zawdzięczają swoim małym rozmiarom. Do tych unikalnych właściwości możemy zaliczyć reaktywność chemiczną, wrażliwość na zmienne warunki środowiska, właściwości antymikrobiologiczne i antyseptyczne, utleniająco-redukujące czy nawet palne [3].

Nanomateriały umożliwiają tworzenie produktów o zwiększonej funkcjonalności z wykorzystaniem bardziej ekologicznych i czystszych procesów produkcyjnych. Zastosowanie nanomateriałów można znaleźć w produktach użytku codziennego np. w filtrach przeciwsłonecznych, kosmetykach, sprzęcie sportowym, elektronice, optyce, żywności, odzieży, jak również w rolnictwie lub medycynie [4].

W ostatnich latach nanotechnologia znacząco wpłynęła na rozwój nauk medycznych. Duży postęp w projektowaniu nanocząstek osiągnięto poprzez badania wpływu nanocząstek na organizm oraz badanie odpowiedzi immunologicznej po podaniu nanocząstek [5]. Unikalne właściwości materiałów w skali nanometrycznej oraz zdolność do manipulowania i dostosowywania ich fizykochemii stwarza wiele możliwości zastosowania ich w medycynie.

Nanomedycyna to nowe podejście do wdrażania systemów nanotechnologicznych w diagnostyce i terapii chorób. Tę gałąź nanotechnologii można podzielić na dwie główne kategorie: nanourządzenia i nanomateriały. Nanotechnologie wykazują znaczny potencjał w dziedzinie medycyny, w tym w technikach obrazowania i narzędziach

¹ martyna.janicka@wihe.pl, Samodzielna Pracownia Nanobiologii i Biomateriałów, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Warszawie, <https://wihe.pl/>; martyna_janicka@sggw.edu.pl, Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, <https://www.sggw.edu.pl/>.

² magdalena.patrycy@wihe.pl, Samodzielna Pracownia Nanobiologii i Biomateriałów, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Warszawie, <https://wihe.pl/>.

³ marcin.chodkowski@wihe.pl, Samodzielna Pracownia Nanobiologii i Biomateriałów, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Warszawie, <https://wihe.pl/>.

⁴ malgorzata.krzyzowska@wihe.pl, Samodzielna Pracownia Nanobiologii i Biomateriałów, Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Warszawie, <https://wihe.pl/>.

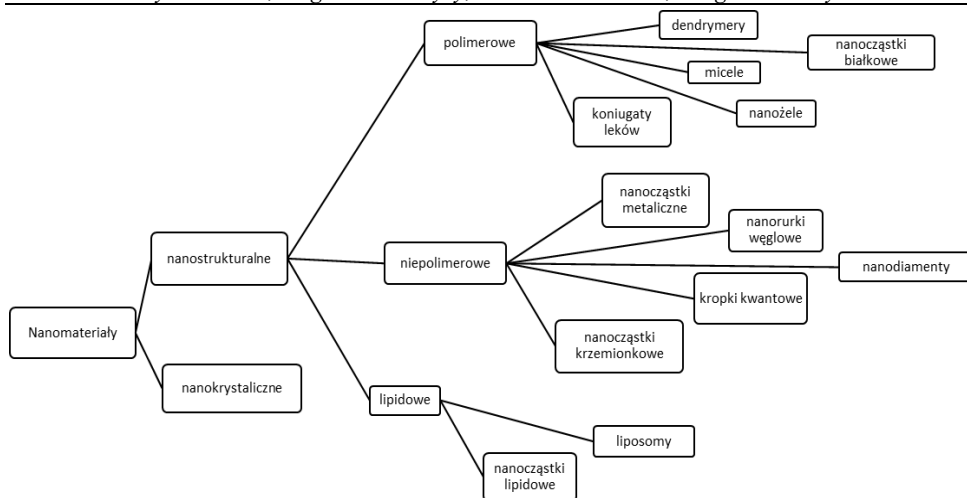
diagnostycznych, systemach dostarczania leków i w konstrukcjach inżynierii tkankowej, implantach i środkach farmaceutycznych. Nowe zaawansowane techniki wspomagają leczenie chorób układu krążenia, raka, cukrzycy, schorzeń układu mięśniowo-szkieletowego, chorób psychicznych i neurodegeneracyjnych, czy infekcji bakteryjnych i wirusowych [6]. Szczególnie interesująca jest możliwość użycia nanocząstek w celu leczenia chorób oraz wykorzystania ich do diagnostyki.

W ostatnich latach zaobserwowano wzrost występowania chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, choroba Huntingtona i pierwotne guzy mózgu [7]. Dokładna etiologia niektórych z wyżej wymienionych chorób nie jest poznana, jak również nie ma wystarczająco skutecznych, dostępnych terapii, często ze względu na niską efektywność leków do skutecznego pokonywania bariery krew-mózg. Nanocząstki uważane są za jeden z najbardziej zadowalających i wszechstronnych systemów dostarczania leków do niedostępnych regionów, takich jak mózg, będąc w stanie zapewnić odpowiednie działanie substancji leczniczych, jednocześnie skutecznie dostarczając je do obszarów zmienionych chorobowo.

2. Nanocząstki i ich rodzaje ze szczególnym uwzględnieniem nanocząstek metali szlachetnych

Nanomateriały ze względu na swój rozmiar i duży stosunek powierzchni do objętości charakteryzują się wyjątkowymi właściwościami optycznymi, mechanicznymi, chemicznymi, elektrycznymi, fizycznymi i magnetycznymi, które sprawiają, że są bardziej reaktywne od ich większych odpowiedników. Dzięki tym cechom materiały w skali nano mogą stymulować i wpływać na określone komórki, indukując i zwielokrotniając pożądane efekty fizjologiczne [8]. Nanomateriały można podzielić na dwie główne kategorie: nanostrukturalne i nanokrystaliczne (rys. 1). Jak dotąd większość nanocząstek zatwierdzonych klinicznie do użytku terapeutycznego to składniki na bazie polimerów (Copaxone, Adagen, Macugen, Naulasta, Ranagel) lub lipidów (Abelcet, AmBisome, DaunoXome, Myocet, Caelyx). Ponadto w fazie badań klinicznych znajduje się wiele preparatów zawierających nanocząstki złota np. AuroLase, NU-0129 czy CNM-Au8 [9].

Kluczową cechą nanocząstek jest ich rozmiar, który determinuje toksyczność, krążenie, biodystrybucję oraz zdolności trafiaania do miejsca docelowego. Po podaniu do organizmu nanocząstki mogą być szybko wychwytywane przez narządy dobrze ukrwione takie jak wątroba, śledziona i szpik kostny [10]. Nanocząstki mniejsze niż 10 nm mogą być skutecznie usuwane przez organizm (filtracja kłębuszkowa), natomiast cząstki większe niż 200 nm mogą być usuwane przez komórki fagocytarne w układzie siateczkowo-śródbłonkowym. W związku z tym nanocząstki terapeutyczne o wielkości <100 nm mają dłuższy czas krążenia w krwiobiegu. W wielu badaniach stwierdzono, że terapeutyczne nanocząstki o wielkości 20-200 nm wykazały wyższy wskaźnik akumulacji, ze względu na brak możliwości rozpoznawania i filtrowania przez nerki. Niemniej jednak korelacja biodystrybucji i eliminacji w odniesieniu do wielkości może znacznie różnić się w zależności od właściwości powierzchni czy modyfikacji nanocząstek [11].



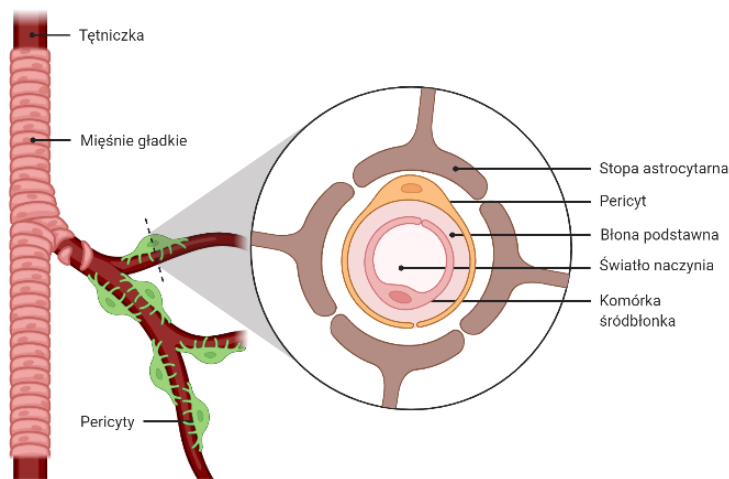
Rysunek 1. Podział nanomateriałów [opracowanie własne na podstawie [11]]

W dziedzinie biomedycy najczęściej badanymi nanocząstkami metalicznymi są nanocząstki srebra (Ag) i złota (Au), pierwsze ze względu na ich aktywność biobójczą wobec szerokiego zakresu szczepów i gatunków bakterii, w tym opornych na antybiotyki, a drugie ze względu na ich zdolność do fotoaktywacji, obojętny charakter, biokompatybilność oraz wysoką wydajność produkcji [12]. Wykorzystywane są jako środki terapeutyczne w leczeniu raka oraz jako narzędzia medyczne do bioobrązowania i biosensingu [13]. W oparciu o badania *in vitro* i *in vivo* nanocząstki Au i Ag uznawane są za obiecujące środki przeciwnowotworowe ze względu na ich skuteczność wobec lekoopornych komórek nowotworowych, jak również zostały wykorzystane w celu hamowania replikacji wielu wirusów DNA i RNA zakażających komórki ośrodkowego układu nerwowego.

3. Bariera krew mózg

Zarówno nanocząstki Ag, jak i Au mogą pokonać barierę krew mózg. Przenikanie nanocząstek do mózgu zależne jest od ich rozmiarów oraz sposobu modyfikacji ich powierzchni. Najczęściej nanocząstki pokonują barierę przy udziale komórek układu immunologicznego oraz powodują lokalne rozszczelnienie bariery. Bariera krew mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB) jest niezbędna dla utrzymania homeostazy ośrodkowego układu nerwowego. Jest ona zbudowana z komórek endotelialnych naczyń włosowatych mózgu oraz astrocytów i pericytów (rys. 2). Ze względu na specyfikę budowy bariery leczenie chorób neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona oraz neuroinfekcji wydaje się być utrudnione. Większość zaproponowanych substancji o potencjale leczniczym ma małe możliwości pokonywania BBB [14]. Tylko małe cząsteczki, takie jak woda, niektóre gazy i związki rozpuszczalne w lipidach, mogą łatwo przenikać przez BBB, dzięki dyfuzji prostej. Natomiast transport dużych cząsteczek o wysokim ładunku elektrycznym, polarności i hydrofilowości jak glukoza, aminokwasy i większość leków transportowane są w sposób aktywny przy udziale białek [15]. Nanocząstki wnikają do ludzkiego ciała na wiele sposobów, takich jak

wdychanie, połykanie, penetracje skóry lub za pomocą iniekcji. Na poziomie komórkowym nanocząstki mogą wnikać do komórek poprzez transport wewnątrzkomórkowy jak fagocytoza, makropinocytoza, endocytoza z udziałem klatryny, kaweoliny, endocytoza bez klatryny i kaweoliny [16].



Rysunek 2. Bariera krew mózg [opracowanie własne za pomocą programu BioRender] [14]

Nanocząstki mogą przekraczać BBB na skutek ich modyfikacji chemicznych np. przyłączenia odpowiednich ligandów, takich jak białka, peptydy, przeciwciała lub najczęściej małe cząsteczki organiczne. Gdy zmodyfikowane nanocząsteczki zostaną rozpoznane przez docelowe komórki, kanały i inne procesy mogą zostać przetransportowane przez barierę. Jednak stosowanie nanocząstek stanowi też pewne ograniczenia związane z ich biodystrybucją po całym organizmie [17]. Ponadto, wielkość i rodzaj nanocząstek może wpływać na ich neurotoksyczność. Po przeniknięciu do krwiobiegu nanocząstki mogą łatwo ulegać agregacji i opsonizacji przez białka gospodarza. Ponadto nanocząstki metaliczne mogą indukować reakcją zapalną, poprzez wytwarzanie cytokin i interferonu co sprawia, że ich użycie może być wykorzystane w leczeniu przeciwwirusowym. Badania Orłowskiego i in., wykazały, że nanocząstki mogą być stosowane jako stymulatory odpowiedzi immunologicznej podczas zakażenia HHV-2 [18].

Cytotoksyczność nanocząstek Ag związana jest ze stresem oksydacyjnym i uwalnianiem jonów Ag^+ pochodzących z rozpuszczania nanocząstek [19]. Aktualny stan wiedzy na temat wpływu nanocząstek Ag na ośrodkowy układ nerwowy jest dość ograniczony. Toksyczność wobec komórek neuronalnych badano w eksperymentach *in vitro*, w których wykazano, że nanocząstki Ag zmniejszają żywotność komórek neuronalnych i glejowych. W neuronach traktowanych nanocząstkami Ag w zakresie stężeń 1-50 $\mu g/ml$ wydłużenie aksonów zostało zahamowane. Natomiast nanocząstki Ag podawane w niskich dawkach nie wpływały bezpośrednio na neurony, jednak powodowały zmiany morfologiczne i biochemiczne w synapsach oraz w osłonkach mieliny otaczających aksony. Obserwacje przy użyciu TEM potwierdzają, że nanocząstki Ag wnikają do astrocytów i odkładane są wewnątrz cytoplazmatycznych pęcherzyków, nie zaburzając znacząco podstawowego metabolizmu ani żywotności komórek glejowych [20]. W przypadku badań prowadzonych na modelu mysim nanocząstki Ag (50 nm) indukowały interakcje z mikronaczyniami mózgu, wytwarzając kaskadę

prozapalną i ostatecznie wywołując zapalenie BBB i degenerację neuronów [21]. Wykazano również, że nanocząstki Ag mogą przemieszczać się z nabłonka węchowego dróg oddechowych do ośrodkowego układu nerwowego przez nerw węchowy. W modelu *in vitro* BBB skonstruowanym przy użyciu pierwotnych komórek śródbłonka mikronaczyń mózgu szczura, nanocząstki Ag (25 nm) indukowały wydzielanie cytokin prozapalnych, interleukin (IL)-1 β , IL-2 i czynnika martwicy nowotworu alfa oraz zwiększały przepuszczalność bariery [22]. W komórkach neuronalnych nanocząstki Ag (20 nm) wywoływały deintegrację elementów cytoszkieletu, zaburzenia receptorów postsynaptycznych i dysfunkcję mitochondriów, co doprowadziło do apoptozy komórek [23]. Jednak dogłębna wiedza na temat sposobów wywoływania przez nanocząstki Ag toksyczności na poziomie komórkowym i molekularnym pozostaje w dużej mierze niezbadana. Ważne jest poznanie wszelkich mechanizmów molekularnych, które mogą zostać aktywowane w obecności nanocząstek Ag, zarówno tych wywierających pozytywną, jak i negatywną odpowiedź.

Nanocząstki Au to drugi rodzaj metalicznych nanocząstek, które są znakomitym materiałem do badań ze względu na stabilność i łatwość syntezy. Niektóre badania wykazały, że nanocząstki Au są pomocne w leczeniu choroby Alzheimera poprzez niszczenie i rozpuszczanie włókienek i blaszek A β [24]. Co ważniejsze, podczas przekraczania BBB, nanocząstki Au nie powodowały uszkodzeń integralności bariery. W badaniu na modelu mysim, w którym nanocząstki były podawane dootrzewnowo, akumulacja nanocząstek Au w mózgu wykazała najniższe stężenie w porównaniu do innych badanych narządów [25].

Najwięcej uwagi badacze poświęcili sferycznym nanocząstkom Au, ale w ostatnich dziesięcioleciach zsyntetyzowano różne kształty (trójkąty, gwiazdki, sześciiany), w celu ulepszenia nanoonośników poprzez modulowanie właściwości chemicznych i fizycznych. Według wielu raportów nanocząstki Au są bardzo biokompatybilne i nietoksyczne. Connor i in. wykazali, że nanocząstki Au o różnych rozmiarach (średnica 4, 12 i 18 nm) oraz środki wchodzące w skład koloidu z nanocząstkami (cytrynian, glukoza, biotyna) wnikają do ludzkich komórek białaczki K562 w warunkach *in vitro*, nie wywołując toksyczności i nie powodują produkcji przez komórkę reaktywnych form tlenu [26]. Podobne wyniki uzyskano dla innych linii komórkowych, takich jak mysie makrofagi Raw 264,7 i komórki dendrytyczne [27, 28].

Wyniki Khongkow i in. wyraźnie pokazują, że transport przez BBB nanocząstek Au przy pomocy genetycznie zmodyfikowanych egzosomów RVG może być wzmożony w porównaniu z nanocząstkami Au pokrytymi niezmodyfikowanymi egzosomami. Sygnał bioluminescencji był obecny w wyciętym mózgu po podaniu zmodyfikowanych egzosomów z nanocząstkami Au, podczas gdy nie był on wykrywalny po potraktowaniu roztworem wodnym. Wynik ten stanowi potwierdzenie skutecznego przejścia nanocząstek Au zawartych w egzosomach do mózgu [29]. Inną modyfikację ułatwiającą przenikanie nanocząstek Au przez BBB opracowali Kim i in., których wyniki wyraźnie wykazały, że antocyjany sprzężone z nanocząstkami PEG-Au mogą przechodzić przez BBB, co więcej nie zaobserwowano znaczącego efektu cytotoksycznego w komórkach neuronalnych. Ponadto, nanocząstki PEG-Au modyfikowane antocyjanami wykazywały pozytywne działanie przeciw neurodegeneracji indukowanej przez A β 1-42 i właściwości przeciwzapalne poprzez szlak sygnałowy NF-kB/JNK/GSK3 β . Nano-



cząstki PEG-Au modyfikowane antocyjanami dają możliwość zastosowania ich jako środka terapeutycznego dla kilku chorób neurodegeneracyjnych, w tym Alzheimera [30].

Ze względu na możliwości przenikania tylko niektórych substancji przez BBB, naukowcy opracowują coraz nowsze i skuteczniejsze modyfikacje. Gromnicova i wsp. zbadali potencjał nanocząstek Au o rozmiarze 4 nm modyfikowanych glukozą. Badacze sprawdzili zależność przenikania nanocząstek Au od rozmiaru 4 i 30 nm oraz ich modyfikacji glukozą lub glutationem. Wykazano, że najwydajniej i najszybciej transportowane były nanocząstki Au o rozmiarze 4 nm modyfikowane glukozą. Zaobserwowano nanocząstki w cytozolu, a nie w endosomach, co wpłynęło na zmniejszenie ryzyka potencjalnej degradacji ładunku powierzchniowego. Ponadto nanocząstki Au wykazywały niską cytotoksyczność, po 24 godzinnej ekspozycji na nanocząstki nie zaobserwowano zmniejszenia żywotności śródbłonna mózgu. Co więcej w badaniach *in vitro* wykazano, że nanocząsteczki Au pokryte glukozą mogą selektywnie przenikać przez śródbłonek ludzkiego mózgu i lokalizować się w astrocytach [31].

4. Potencjalne użycie nanocząstek metali szlachetnych (ze szczególnym uwzględnieniem neuroinfekcji wirusowych – jako nośniki leków, substancji o potencjale przeciwwirusowym)

Na całym świecie około 1,5 miliarda ludzi cierpi na różne zaburzenia ośrodkowego układu nerwowego, w tym choroby neurodegeneracyjne. Brakuje skutecznych metod leczenia większości z nich, często ze względu na niezdolność leków do skutecznego przenikania do ośrodkowego układu nerwowego, dlatego opracowanie skutecznych strategii celowanego dostarczania leków do mózgu jest niezwykle istotne [32].

Dostarczanie leków za pomocą nanocząstek ma wiele zalet, takich jak nieinwazyjność, niski koszt, dobra biodegradowalność i długoterminowa stabilność, łatwość syntezy, wysoka skuteczność celowania oraz możliwość kontroli dostarczania i uwalniania leków przez BBB [33]. Na początku ważne jest zrozumienie patogenezы wirusów oraz systemów dostarczania nanocząstek jako leków. Nanocząstki wprowadzane są do organizmu donosowo, doustnie lub dożylnie, w celu transportu do miejsca infekcji.

Utrudnienia w postępie opracowywania leków przeciwwirusowych o szerokim spektrum działania, to przede wszystkim ich specyficzny tropizm tkankowy oraz zależność replikacji wirusów od procesów biosyntezy zachodzących w komórkach gospodarza. Dotychczasowe leki przeciwwirusowe charakteryzują się ograniczoną skutecznością, nie leczą utajonej infekcji, jedynie działają w sposób doraźny. Ograniczenia spowodowały potrzebę zmiany paradygmatu oraz opracowanie nowych formuł leków. Użycie nowych strategii naukowych podczas przygotowywania oraz dopracowania dawkowania leków wiąże się ze zmianą ich właściwości fizykochemicznych i biofarmaceutycznych, a także biodostępności [34].

Nanocząstki jako nośniki leków, czy też użyte samodzielnie w terapiach przeciwwirusowych, wzbudzają coraz większe zainteresowanie wśród naukowców. Zwłaszcza, że mechanizmy za pomocą których, na przykład, wirus opryszczki typu 1 (HHV-1) przenika do ośrodkowego układu nerwowego, pozostają niejasne. Najbardziej prawdopodobnymi drogami jest transport wsteczny przez włókna nerwu węchowego lub nerwu trójdzielnego, mogący prowadzić do opryszczkowego zapalenia mózgu (HSE) wywołanego przez HHV-1 [35]. Innym wirusem, który prowadzi do zapalenia mózgu i zaburzeń neurologicznych jest ludzki wirus niedoboru odporności (HIV).

Dhanasezhian i wsp. zbadali aktywność przeciwwirusową przeciwko szczepom HHV-1 oraz wirusa opryszczki typu 2 (HHV-2) używając biogennych nanocząstek Au i Ag przygotowanych przy użyciu wodorostów *Sargassum wightii*. Badania *in vitro* wykazały 70% spadek efektu cytotatycznego w hodowli Vero dla obu szczepów, przy stężeniu 10 µg/ml i 25 µg/ml nanocząstek Au, podczas gdy podobne zmniejszenie efektu cytotatycznego zauważono przy stężeniu tylko 2,5 µg/ml nanocząstek Ag. Wyższe stężenia nanocząstek Ag powodowały zwiększone działanie cytotoksyczne. Potwierdzono tym założenie, że funkcjonalizowane metaliczne nanocząstki działają jako środki przeciwwirusowe poprzez blokowanie przyłączeń wirusów i dostępu do komórek, w zależności od wielkości cząstek [36].

Nanocząstki Ag znane są z działania przeciwdrobnoustrojowego przeciwko różnym mikroorganizmom, w tym grzybom, bakteriom (gram dodatnim i gram ujemnym) i wirusom (RSV, wirus zapalenia wątroby typu B, HSV-1, HIV-1). Wielkość nanocząstek Ag odgrywa istotną rolę w określaniu ich potencjału przeciwwirusowego. Mniejsze cząstki ze względu na ich wysoką swobodną energię powierzchniową wykazują zwiększone rozpuszczanie, a aktywność transportowa ostatecznie prowadzi do większej aktywności przeciwdrobnoustrojowej [37]. Dane literaturowe sugerują, że cząstki o wielkości poniżej 10 nm wykazywały znaczącą aktywność przeciwwirusową przeciwko HIV-1, ponieważ silnie wiązały się z resztą zawierającą siarkę w glikoproteinie otoczkowej gp120, która ogranicza fuzję wirusa z receptorami CD4 komórki gospodarza [38]. Pierwszą firmą farmaceutyczną, która zbadła i opisała działanie przeciwwirusowe nanocząstek Ag przeciwko HIV-1, była firma Galdiero. Hipoteza sugerowała, że interakcje między cząstkami skoniugowanymi z albuminą surowicy bydlęcej (BSA, bovine serum albumin) i wirionami HIV są zależne od wielkości. Badanie wykazało, że tylko nanocząstki Ag w zakresie 1-10 nm są zdolne do wiązania się z wirionami. Po związaniu, udowodniono, że hamują etapy zakażenia po wejściu wirusa poprzez konkurencję z atomami siarki i tlenu przyłączonymi do grup tiolowych lub fosforanowych na aminokwasach lub kwasach nukleinowych. Te interakcje ułatwiły zmniejszenie działania odwrotnej transkryptazy HIV-1, dzięki której RNA HIV-1 wbudowuje się do materiału genetycznego gospodarza, gdzie ulega replikacji i dalej rozprzestrzenia się w organizmie [39].

Lu i in. zsyntetyzowali 10 nm i 50 nm nanocząstki Ag i zaobserwowali, że hamują wytwarzanie zapalenia wątroby typu B *in vitro*, a co więcej większe nanocząstki wykazywały lepszą aktywność. Autorzy przypuszczają, że przeciwwirusowy mechanizm działania nanocząstek Ag jest związany z interakcjami z dwuniciowym DNA wirusa. Speshock i wsp. wykazali, że nanocząstki Ag o rozmiarze 10 nm są zdolne do hamowania aktywności wirusa Tacaribe we wczesnych etapach replikacji. Inna grupa ujawniła zdolność nanocząstek Ag o rozmiarze 4 nm z dodatkiem sulfonianu merkaptolanolu można stosować do zahamowania replikacji HHV-1. [9]

Drugim typem nanocząstek badanych pod kątem działania przeciwwirusowego są nanocząstki Au. Ze względu na swoją strukturę, nanocząstki Au posiadają szczególne właściwości optyczne spowodowane oscylacją wolnych elektronów. Jest to przydatne w obrazowaniu funkcjonalności cząstek. Badania obrazowe potwierdzają te obserwacje, pokazując, że gdy nanocząstki Au dostaną się do mózgu, szybko znikają. Wstrzyknięcie nanocząstek Au do tętnicy szyjnej zwiększa penetrację cząstek w mózgu, chociaż ich dyfuzja w mięszu jest ograniczona do kilku mikronów z widocznych

naczyń. Wielokrotne leczenie może zwiększyć penetrację nanocząstek Au w mózgu, chociaż niekontrolowana akumulacja nanocząstek Au w neuronach może wywołać pewne niekorzystne skutki, takie jak zmiany właściwości pobudzania neuronów [40]. Dlatego musimy wziąć pod uwagę ten aspekt, planując strategie terapeutyczne dla chorób przewlekłych/zastosowania.

Spinelli i in. zaobserwowali silną akumulację nanocząstek znakowanych Cy5.5-Au w ośrodkowym układzie nerwowym myszy, po pojedynczym wstrzyknięciu dooponowym. Zaobserwowano przy użyciu obrazowania optycznego *in vivo*, że myszy otrzymujące nanocząstki Cy5.5-Au wykazywały zatrzymywanie cząstek w mózgu przez ponad 20 dni. Analizy za pomocą mikroskopii konfokalnej i elektronowej wykazały, że nanocząstki Cy5.5-Au internalizują się w rozproszonych neuronach. Podwójne barwienie nanocząstek Cy5.5-Au i markerów neuronów, mikrogleju i astrocytów ujawniło, że wnikanie nanocząstek Au było znaczące w neuronach [41].

Badania pokazują, że nanocząstki Au są w stanie dotrzeć do komórek, które HIV wykorzystuje jako rezerwuary replikacyjne: limfocyty, makrofagi i komórki śródbłónka w mózgu. Aby uzyskać dostęp do tych obszarów, naukowcy dołączyli grupę tiolową, która służy jako łącznik między lekiem raltegravirem i nanocząstkami Au. Raltegravir jest organicznym związkiem chemicznym stosowanym jako lek przeciw-wirusowy z grupy inhibitorów integrazy. Kiedy nanocząsteczki Au połączone z raltegravirem dostały się do zakażonych komórek jednojądrzastych krwi obwodowej wykazały hamowanie replikacji wirusa HIV. Podczas wykonywania tego samego eksperymentu stosując tylko nanocząstki Au nie zaobserwowano aktywności przeciw-wirusowej [42].

Nanocząstki Au przebadano również pod kątem czynników wywołujących uszkodzenie budowy wirionów, w celu obniżenia zakaźności. Cango i in. dołączając modyfikacje, które naśladują proteoglikany takie jak siarczanu heparanu (HSPG) do powierzchni nanocząstek Au wykazali, że nanocząstki mogą przyczepiać się do wirusowych ligandów i poprzez generowanie silnych oddziaływań dezintegrować wiriony. Cząstki były nietoksyczne dla komórek i skuteczne przeciwko nie jednemu, ale kilku wirusom, w tym HHV, HPV, RSV i wirusowi dengi. Możliwa jest dalsza stabilizacja nanocząstek złota kwasem galusowym. Rezultatem są monodispersyjne, sferyczne nanocząstki Au o wielkości 7-8 nm. Te nanocząstki mogą selektywnie hamować działanie wirusów o ulepszonym profilu bezpieczeństwa w porównaniu z lekami dostępnymi obecnie na rynku, takimi jak acyklowir. Takie nanocząstki mają działać poprzez zapobieganie przyczepianiu się wirusów, a tym samym ich penetracji [43].

Hiperfosforylacja białka Tau jest cechą charakterystyczną choroby Alzheimera i wiąże się z odkładaniem splotów neurofibrylarnych. Model kwasu okadaikowego (OA) indukuje wzrost fosforylacji Tau w korze i hipokampie, a leczenie nanocząstkami Au zapobiega hiperfosforylacji w obu strukturach. Kwas okadaikowy to toksyna wytwarzana przez morskie mikroalgi. Model OA charakteryzuje się zaburzoną funkcją poznawczą, badanie dos Santos Tramontin i in. wykazało, że nanocząstki Au zapobiegały temu zaburzonemu działaniu poznawczemu, być może dlatego, że fosforylacja Tau była prawidłowa w korze i hipokampie. Wynika z tego, że nanocząstki Au mogą być bezpieczne i skuteczne w leczeniu chorób mózgu, podczas gdy większość obecnie dostępnych leków wykazuje skutki uboczne [44].

Nanocząstki metali szlachetnych coraz częściej i chętniej są wykorzystywane przez naukowców i firmy farmaceutyczne do celów terapeutycznych. Bezpieczeństwo ich nadal poddawane jest testom, zarówno na modelach *in vitro*, jak i *in vivo*. Dokładne poznanie cytotoksyczności nanocząstek pozwoli opracowywać odpowiednio zmodyfikowane metale, które będą niwelowały jej skutki. Ponadto coraz częściej uzyskuje się nanocząstki wykorzystując tzw. syntezę zieloną, czyli otrzymywane są przy wykorzystaniu naturalnych właściwości redukcyjnych roślin. Pomimo wielu niezbadanych mechanizmów, cytotoksyczności zależnej od dawki i rozmiaru, nanocząstki stanowią obiecującą formę leku, jak i donoru substancji leczniczych do miejsc zmienionych chorobowo.

5. Wnioski

- Nanocząstki złota i srebra stanowią obiecującą metodę leczenia chorób ośrodkowego układu nerwowego o różnej etiologii.
- Rozmiar oraz modyfikacja chemiczna nanocząstek Au i Ag są istotne dla penetracji BBB oraz ich działania.
- Neurotoksyczność nanocząstek skorelowana jest z ich rozmiarem oraz dawką.
- Dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazują na ważną rolę nanocząstek złota i srebra w terapiach ośrodkowego układu nerwowego, jednak danych dotyczących modeli *in vivo* nadal jest niewystarczająco.

Literatura

1. Khan I., Saeed K., Khan I., *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*, *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 2019, s. 908-931.
2. Contera S., Bernardino de la Serna J., Tetley T.D., *Biotechnology, nanotechnology and medicine*, *Emerging Topics in Life Sciences*, 4(6), 2020, s. 551-554.
3. Ealia S.A.M., Saravanakumar M.P., *A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application*, In IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 263(3), 2017, s. 032019.
4. Gupta D.S.K., *Study of Nanotechnology and Its Application*, *Journal of Physics & Optics Sciences*, 2(1), 2020, s. 2.
5. Woldeamanuel K.M., Kurra F.A., Roba Y.T., *A review on nanotechnology and its application in modern veterinary science*, *International Journal of Nanomaterials, Nanotechnology and Nanomedicine*, 7(1), 2021, s. 026-031.
6. Sim S., Wong N.K. *Nanotechnology and its use in imaging and drug delivery*, *Biomedical reports*, 14(5), 2021, s. 1-9.
7. de Bem Silveira G., Muller A.P., Machado-de-Ávila R.A., Silveira P.C.L., *Advance in the use of gold nanoparticles in the treatment of neurodegenerative diseases: new perspectives*, *Neural Regeneration Research*, 16(12), 2021, s. 2425.
8. Sawicki K., Czajka M., Matysiak-Kucharek M., Fal B., Drop B., Męczyńska-Wielgosz S., Sikorska K., Kruszewski M., Kapka-Skrzypczak L., *Toxicity of metallic nanoparticles in the central nervous system*, *Nanotechnology Reviews*, 8(1), 2019, s. 175-200.
9. Klębowski B., Depciuch J., Parlińska-Wojtan M., Baran J., *Applications of noble metal-based nanoparticles in medicine*, *International journal of molecular sciences*, 19(12), 2018, s. 4031.
10. Liao C., Li Y., Tjong S.C., *Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles*, *International journal of molecular sciences*, 20(2), 2019, s. 449.
11. Yetisgin A.A., Cetinel S., Zuvin M., Kosar A., Kutlu O., *Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications*, *Molecules*, 25(9), 2020, s. 2193.



12. Rabiee N., Ahmadi S., Akhavan O., Luque R., *Silver and Gold Nanoparticles for Antimicrobial Purposes against Multi-Drug Resistance Bacteria*, Materials, 15(5), 2022, s. 1799.
13. Nejati K., Dadashpour M., Gharibi T., Mellatyar H., Akbarzadeh A., *Biomedical applications of functionalized gold nanoparticles: a review*, Journal of Cluster Science, 2021, s. 1-16.
14. Asil S.M., Ahlawat J., Barroso G.G., Narayan M., *Nanomaterial based drug delivery systems for the treatment of neurodegenerative diseases*, Biomaterials science, 8(15), 2020, s. 4109-4128.
15. Zhou Y., Peng Z., Seven E.S., Leblanc R.M., *Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles*, Journal of controlled release, 270, 2018, s. 290-303.
16. Panzarini E., Mariano S., Carata E., Mura F., Rossi M., Dini L., *Intracellular transport of silver and gold nanoparticles and biological responses: An update*, International journal of molecular sciences, 19(5), 2018, s. 1305.
17. Zhang W., Mehta A., Tong Z., Esser L., Voelcker N.H., *Development of polymeric nanoparticles for blood–brain barrier transfer – strategies and challenges*, Advanced Science, 8(10), 2021, s. 2003937.
18. Orłowski P., Kowalczyk A., Tomaszewska E., Ranoszek-Soliwoda K., Węgrzyn A., Grzesiak J., Celichowski G., Grobelny J., Eriksson K., Krzyzowska M., *Antiviral activity of tannic acid modified silver nanoparticles: potential to activate immune response in herpes genitalis*, Viruses, 10(10), 2018, s.524.
19. De Matteis V., Malvindi M.A., Galeone A., Brunetti V., De Luca E., Kote S., Kshirsagar P., Sabella S., Bardi G., Pompa P.P., *Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: the role of Ag⁺ ion release in the cytosol*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 11(3), 2015, s. 731-739.
20. Strużyńska L., Skalska J., *Mechanisms underlying neurotoxicity of silver nanoparticles*, Cellular and Molecular Toxicology of Nanoparticles, 2018, s. 227-250.
21. Akter M., Sikder M.T., Rahman M.M., Ullah A.A., Hossain, K.F.B., Banik S., Hosokawa T., Saito T., Kurasaki M., *A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives*, Journal of advanced research, 9, 2018, s. 1-16.
22. Trickler W.J., Lantz S.M., Murdock R.C., Schrand A.M., Robinson B L., Newport G.D., Schlager J.J., Oldenburg S.J., Paule M.G., Slikker W., Hussain S.M., Ali S.F., *Silver nanoparticle induced blood-brain barrier inflammation and increased permeability in primary rat brain microvessel endothelial cells*, Toxicological Sciences, 118(1), 2010, s. 160-170.
23. Repar N., Li H., Aguilar J.S., Li Q.Q., Drobne D., Hong Y., *Silver nanoparticles induce neurotoxicity in a human embryonic stem cell-derived neuron and astrocyte network*, Nanotoxicology, 12(2), 2018, s. 104-116.
24. Zhao J., Xu N., Yang X., Ling G. Zhang P., *The roles of gold nanoparticles in the detection of amyloid- β peptide for Alzheimer's disease*, Colloid and Interface Science Communications, 46, 2022, s. 100579.
25. Pannerselvam B., Dewanathadesikan V., Alagumuthu T.S., Kanth S.V., Thangavelu K.P., *Assessment of in-vivo biocompatibility evaluation of phyto-genic gold nanoparticles on Wistar albino male rats*, IET nanobiotechnology, 14(4), 2020, s. 314-324.
26. Connor E.E., Mwamuka J., Gole A., Murphy C.J., Wyatt M.D., *Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity*, Small, 1(3), 2005, s. 325-327.
27. Xie X., Liao J., Shao X., Li Q., Lin Y., *The effect of shape on cellular uptake of gold nanoparticles in the forms of stars, rods, and triangles*, Scientific reports, 7(1), 2017, s. 1-9.
28. Ahmad S., Zamry A.A., Tan H.T.T., Wong K.K., Lim J., Mohamud R., *Targeting dendritic cells through gold nanoparticles: a review on the cellular uptake and subsequent immunological properties*, Molecular immunology, 91, 2017, s. 123-133.

29. Khongkow M., Yata T., Boonrungsiman S., Ruktanonchai U.R., Graham D., Namdee K., *Surface modification of gold nanoparticles with neuron-targeted exosome for enhanced blood–brain barrier penetration*, Scientific reports, 9(1), 2019, s. 1-9.
30. Kim M.J., Rehman S.U., Amin F.U., Kim M.O., *Enhanced neuroprotection of anthocyanin-loaded PEG-gold nanoparticles against A β 1-42-induced neuroinflammation and neurodegeneration via the NF-KB/JNK/GSK3 β signaling pathway*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 13(8), 2017, s. 2533-2544.
31. Gromnicova R., Davies H.A., Sreekanthreddy P., Romero I.A., Lund T., Roitt I.M., James B.P., Male D.K., *Glucose-coated gold nanoparticles transfer across human brain endothelium and enter astrocytes in vitro*, Public Library of Science One, 8(12), 2013, s. 81043.
32. Barchet T.M., Amiji M.M., *Challenges and opportunities in CNS delivery of therapeutics for neurodegenerative diseases*, Expert opinion on drug delivery, 6(3), 2009, s. 211-225.
33. Ding S., Khan A.I., Cai X., Song Y., Lyu Z., Du D., Dutta P., Lin Y., *Overcoming blood–brain barrier transport: Advances in nanoparticle-based drug delivery strategies*, Materials today, 37, 2020, s. 112-125.
34. Cojocar F.D., Botezat D., Gardikiotis I., Uritu C.M., Dodi G., Trandafir L., Rezus C., Rezus E., Tamba B.I., Mihai C.T., *Nanomaterials designed for antiviral drug delivery transport across biological barriers*, Pharmaceutics, 12(2), 2020, s. 171.
35. Liu H., Qiu K., He Q., Lei Q., Lu W., *Mechanisms of blood-brain barrier disruption in herpes simplex encephalitis*, Journal of Neuroimmune Pharmacology, 14(2), 2019, s. 157-172.
36. Dhanasezhian A., Srivani S., Govindaraju K., Parija P., Sasikala S., Kumar M.R., *Anti-Herpes Simplex Virus (HSV-1 and HSV-2) activity of biogenic gold and silver nanoparticles using seaweed Sargassum wightii*, Indian Journal of Geo Marine Sciences, 48 (08), 2019, s. 1252-12572019.
37. Tang S., Zheng J., *Antibacterial activity of silver nanoparticles: structural effects*, Advanced healthcare materials, 7(13), 2018, s. 1701503.
38. Elechiguerra J.L., Burt J.L., Morones J.R., Camacho-Bragado A., Gao X., Lara H.H., Yacamán M.J., *Interaction of silver nanoparticles with HIV-1*, Journal of nanobiotechnology, 3(1), 2005, s. 1-10.
39. Maus A., Strait L., Zhu D., *Nanoparticles as delivery vehicles for antiviral therapeutic drugs*, Engineered Regeneration, 2, 2021, s. 31-46.
40. Nance E., Zhang C., Shih T.Y., Xu Q., Schuster B.S., Hanes J., *Brain-penetrating nanoparticles improve paclitaxel efficacy in malignant glioma following local administration*, American Chemical Society (ACS) nano, 8(10), 2014, s. 10655-10664.
41. Spinelli A., Girelli M., Arosio D., Polito L., Podini P., Martino G., Seneci P., Muzio L., Menegon A., *Intracisternal delivery of PEG-coated gold nanoparticles results in high brain penetrance and long-lasting stability*, Journal of Nanobiotechnology, 17(1), 2019, s. 1-13.
42. Garrido C., Simpson C.A., Dahl N.P., Bresee J., Whitehead D.C., Lindsey E.A., Harris T.L., Smith C.A., Carter C.J., Feldheim D.L., Melander C., Margolis, D.M., *Gold nanoparticles to improve HIV drug delivery*, Future medicinal chemistry, 7(9), 2015, s. 1097-1107.
43. Cagno V., Andreozzi P., D'Alicarnasso M., Jacob Silva P., Mueller M., Galloux M., Le Goffic R., Jones S.T., Vallino M., Hodek J., Weber J., Sen S., Janecek E.R., Bekdemir A., Sanavio B., Martinelli C., Donalisio M., Rameix Welti M.A., Eleouet J.F., Han y., Kaiser L., Vukovic I., Tapparel C., Kral P., Krol S., Lembo D., Stellacci F., *Broad-spectrum non-toxic antiviral nanoparticles with a virucidal inhibition mechanism*, Nature materials, 17(2), 2018, s. 195-203.
44. dos Santos Tramontin N., da Silva S., Arruda R., Ugioni K.S., Canteiro P.B., de Bem Silveira G., Mendes C., Silveira P.C.L., Muller A.P., *Gold nanoparticles treatment reverses brain damage in Alzheimer's disease model*, Molecular neurobiology, 57(2), 2020, s. 926-936.



Nanocząstki metali szlachetnych i ich wpływ na funkcjonowanie komórek układu nerwowego

Streszczenie

Nanocząstki metali szlachetnych coraz częściej pojawiają się w literaturze jako substancje o potencjale leczniczym. Wiek XX i XXI to intensywny rozwój nanotechnologii, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania nanocząstek w terapiach wielu chorób, w tym nowotworowych oraz ośrodkowego układu nerwowego. Z powodu niewystarczających efektów terapeutycznych w przypadku leczenia chorób neurodegeneracyjnych istnieje konieczność poszukiwania metod alternatywnych jakimi są właśnie nanocząstki. Celem pracy było usystematyzowanie dostępnej wiedzy na temat nanocząstek metali szlachetnych srebra i złota, ich neurotoksyczności oraz możliwości wykorzystania w przypadku chorób układu nerwowego w tym neuroinfekcji wywołanych przez wirusy.

Słowa kluczowe: nanocząstki srebra, nanocząstki złota, bariera krew mózg

Noble metal nanoparticles and their activity upon cells of the nervous system

Abstract

Noble metal nanoparticles are increasingly appearing in the literature as substances with therapeutic potential. The twentieth and twenty-first centuries are the period of intensive development of nanotechnology, with particular emphasis on the use of nanoparticles in the treatment of many diseases, including cancer and diseases of the central nervous system. Due to insufficient therapeutic effects in the treatment of neurodegenerative diseases, there is a constant need to search for alternative methods, such as nanoparticles. This study aimed to systematize the available knowledge on noble metal nanoparticles of silver and gold, their neurotoxicity, and their possible use for nervous system diseases, including neuroinfections caused by viruses.

Keywords: silver nanoparticles, gold nanoparticles, blood brain barrier

Metody metagenomiczne w badaniu mikrobiomu jelitowego człowieka

1. Wprowadzenie

Mikroorganizmy zamieszkujące ciało człowieka to nie tylko komensale i groźne patogeny, ale także organizmy symbiotyczne pełniące kluczową rolę w zachowaniu homeostazy gospodarza. Badania metagenomiczne wykorzystujące techniki sekwencjonowania nowej generacji i metody bioinformatyczne pozwalają na dogłębne poznanie mikrobiomu ludzkiego i poszukiwanie jego związku ze stanem zdrowia człowieka. Celem pracy jest omówienie różnych metodologii badawczych stosowanych w poznaniu mikrobiota jelitowej, począwszy od klasycznych metod hodowlanych, mikrobiologicznego profilowania opartego o analizę sekwencyjną zakonserwowanego ewolucyjnie genu markerowego (np. wysokoprzepustowe sekwencjonowanie oparte o gen 16S rDNA jest uważane jako złoty standard w badaniu mikrobiota), aż po właściwą analizę metagenomiczną typu *shotgun*, opartą o sekwencjonowanie nowej generacji (NGS – ang. *next-generation sequencing*).

2. Mikrobiom człowieka

W momencie narodzin organizm człowieka jest już skolonizowany przez pierwsze drobnoustroje. Jednym ze źródeł pierwotnej mikroflory bakteryjnej mogą być drogi rodne matki podczas porodu dziecka, co zdają się potwierdzać różnice w mikrobiomie między dziećmi urodzonymi naturalnie a tymi, które przyszły się na świat poprzez cesarskie cięcie [1]. Wedle innych hipotez, pierwsza kolonizacja zachodzi już we wnętrzu macicy, o czym świadczy wykrycie drobnoustrojów w łożysku i w płynie owodniowym [2], jednakże teoria ta nie ma szerokiej akceptacji. Niezależnie od tego jakie jest źródło pierwotnej mikroflory bakteryjnej, mikrobiom noworodka z czasem dojrzewa pod wpływem czynników wewnętrznych i zewnętrznych. Pierwotnie zakładano, że mikrobiom u dzieci około 3. roku życia jest już dojrzały, jednak nowsze badania wskazują, że jego rozwój trwa dalej w późniejszym dzieciństwie [3].

Człowiek żyje w symbiotycznej relacji ze swoim mikrobiomem jelitowym, który wpływa na wiele aspektów jego zdrowia. Pod wieloma względami mikrobiom człowieka jest bardzo imponujący. Pod względem ilości komórek, zawartość bakterii w organizmie człowieka jest tego samego rzędu co ilość komórek ludzkich [4], a pod względem genetycznym mikrobiom zawiera aż 3,3 miliona unikalnych genów [5], co wielokrotnie przewyższa ilość genów w genomie człowieka. Mikrobiota jelitowa wpływa na zdrowie człowieka na wiele sposobów. Zaburzenia mikrobioty jelitowej zostały powiązane z takimi schorzeniami jak choroba zapalna jelita, zespół jelita drażliwego, depresja [6], a także ze schorzeniami autoimmunologicznymi [7]. Mikrobiom jelitowy

¹ barostro2@student.pg.gda.pl, Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii.

² Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii.

jest postrzegany obecnie jako integralna część organizmu człowieka, która wpływa na metabolizm, chroni przed patogenami oraz moduluje aktywność układu odpornościowego [8]. Transplantacja mikrobiomu jelitowego jest skuteczna w leczeniu nawracających infekcji wywołanych przez *Clostridium difficile*, ale potencjalnie może być wykorzystana również przy innych schorzeniach [9]. Większość badań skupia się na mikrobiomie jelitowym, gdyż jest on najbogatszy, jednak inne części ciała człowieka, takie jak skóra [10], układ moczowy [11], jama ustna [12] posiadają swój własny charakterystyczny mikrobiom. Biorąc pod uwagę zarówno skalę, jak i wpływ mikrobiota na zdrowie człowieka, nie dziwi nas, iż wiedza na jego temat stanowi bardzo pręźnie rozwijającą się dziedzinę nauki. Dzieje się to w znacznej mierze dzięki wykorzystaniu nowoczesnych technik metagenomicznych.

3. Metody metagenomiczne

Klasyczne metody badań nad mikroorganizmami polegają na wykonaniu posiewu z badanej próbki na podłoże mikrobiologiczne, inkubacji a następnie izolacji czystych kultur bakteryjnych i identyfikacji na podstawie obserwacji cech fenotypowych z użyciem testów biochemicznych oraz specjalistycznych podłoży hodowlanych (wybiórczo-różnicujących). Trudność w hodowli bakterii beztlenowych, które obficie występują w jelicie, poważnie wpływa na dokładność analizy. Metody hodowlane mają też inne ograniczenia, ponieważ większości gatunków bakterii wciąż nie udaje się wyhodować metodami *in vitro* [13]. Brak dostatecznej wiedzy na temat warunków hodowli pewnych grup drobnoustrojów, jak również niewłaściwe przechowywanie próbki kału bądź jej transport do laboratorium mogą zaważyć na wiarygodności badania [14]. Ponadto, drobnoustroje w organizmie człowieka nie występują w formie pojedynczych gatunków bakterii czy luźnych skupisk, lecz tworzą skomplikowane społeczności żyjące w postaci wielogatunkowych biofilmów, porozumiewając się i oddziałując na siebie [15]. Stąd, badanie czystych kultur mikroorganizmów nie odzwierciedla rzeczywistych cech tych mikroorganizmów w ich naturalnych niszach ekologicznych i panujących tam oddziaływań między drobnoustrojami. Metody metagenomiczne mają na celu obejście tych problemów poprzez badanie całości materiału genetycznego zawartego w próbce bez wcześniejszej izolacji czystych kultur bakteryjnych. Dzięki nowym technikom sekwencjonowania można zsekwencjonować całą pulę DNA zawartą w próbce – jej metagenom. Badania metagenomiczne nie obejmują cech fenotypowych badanych organizmów, gdyż analizie podlega jedynie ich materiał genetyczny. Otrzymane w ten sposób dane są niezwykle skomplikowane i pofragmentowane, gdyż pochodzą od olbrzymiej ilości mikroorganizmów, jednakże ich analiza jest możliwa dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod bioinformatycznych.

Eksperyment metagenomiczny rozpoczyna się od wyselekcjonowania próbek badanego materiału. Ilość potrzebnych próbek jest zwykle ustalana przy użyciu krzywej rarefakcji (rozrzedzenia) (ang. *rarefaction curve*), określającej zależność między ilością identyfikowanych gatunków, a ilością np. osób od których pobierane są próbki [16]. Krzywa rarefakcji bogactwa gatunkowego jest jedyną miarą czułą na gatunki rzadkie, niezależnie od wielkości próbki [17]. Próbki pobrane od ludzi mogą być w znacznym stopniu zanieczyszczone przez DNA gospodarza, stąd konieczne jest ich oczyszczenie poprzez frakcjonowanie, które można wykonać poprzez filtrację, wirowanie czy poprzez wykorzystanie cytometru przepływowego. Podobnie należy postąpić,



gdy obiektem zainteresowania jest jedynie część metagenomu, np. gdy chcemy odzielić wirusy od bakterii [18].

Po izolacji materiału genetycznego następuje etap sekwencjonowania. W ciągu ostatnich lat nastąpił szybki rozwój technik sekwencjonowania nowej generacji, które pozwalają na jednoczesne równoległe sekwencjonowanie wielu fragmentów DNA bez konieczności ich fizycznej separacji do oddzielnych próbek czy kapilar reakcyjnych [19]. Obiektem sekwencjonowania dla bakterii bądź archeonów jest zwykle gen kodujący podjednostkę 16S rRNA, z kolei dla organizmów eukariotycznych wykorzystuje się gen kodujący podjednostkę 18S rRNA bądź sekwencje ITS (ang. *internal transcribed spacer*) [20]. Profilowanie mikrobiota oparte na genie markerowym 16S rDNA uważane jest za złoty standard. Gen 16S rDNA jest silnie zakonserwowany ewolucyjnie, lecz posiada także regiony polimorficzne (zmienne) pozwalające na identyfikację gatunkową [21]. Gen kodujący 16S rRNA obejmuje dziewięć różnych zmiennych regionów, V1-V9, każdy oflankowany przez wysoce konserwatywne sekwencje DNA, które są odpowiednie do wiązania startera PCR [22]. Alternatywą dla katalogowania mikroflory jelitowej człowieka za pomocą profilowania mikrobiologicznego genu 16S rDNA jest sekwencjonowanie metagenomiczne typu *shotgun*. Takie podejście omija specyficzną dla genu amplifikację i potencjalnie sekwencjonuje wszystkie (pofragmentowane) DNA wyekstrahowane z analizowanej próbki środowiskowej, w tym z niesklasyfikowanych bakterii i wirusów. Metagenomika *shotgun* dostarcza znacznie więcej informacji, w tym wgląd w funkcjonalne aspekty społeczności drobnoustrojów, w odróżnieniu do profilowania drobnoustrojów opartego na genach 16S rDNA [23].

Obecnie najpopularniejszą platformą NGS jest system Illumina opracowany w latach 90. przez Shankara Balasubramaniana i Davida Klenermana z University of Cambridge. System Illumina oparty jest na bibliotece losowych fragmentów DNA z dołączonymi adapterami i wiązanych dwoma końcami do powierzchni płytki. Technologia ta wykorzystuje usuwalne ddNTP wyznakowane fluorescencyjnie. Po każdym cyklu przyłączania zasady znacznik fluorescencyjny jest odcinany i dokonuje się pomiaru fluorescencji [24]. Zastosowanie różnych barwników fluorescencyjnych dla każdej zasady pozwala na wprowadzenie wszystkich czterech dNTP do kapilary reakcyjnej jednocześnie i minimalizuje ryzyko nieprawidłowego przyłączenia [25]. Rekomendowana długość odczytu dla systemów Illumina sięga od 150 do 300 par zasad [26], a częstotliwość występowania błędów mieści się w zakresie od 0,087% dla techniki Hi Seq X10 do 0,613% dla techniki Mini Seq [27]. Do innych metod sekwencjonowania należą między innymi techniki SOLiD i Ion Torrent. Metoda Ion Torrent wykorzystuje fragmenty DNA immobilizowane na powierzchni kulek silikonowych, które umieszczane są w studzienkach detekcyjnych, do której następnie wprowadza się kolejno każdy z nukleotydów. Przyłączenie danej zasady nukleotydowej wykrywa się poprzez detekcję emisji jonów wodorkowych powstałych w reakcji przyłączania z wykorzystaniem detektora półprzewodnikowego. Długość odczytu wynosi około 200 par zasad [28]. Wadą metody jest występowanie błędów przy oznaczaniu sekwencji homopolimerycznych, chociaż ich częstotliwość jest mniejsza niż w przypadku pirosekwencjonowania [29]. Metoda SOLiD, opracowana przez firmę Applied Biosystems w przeciwieństwie do pozostałych metod nie opiera się na syntezie nowej nici DNA, lecz wykorzystuje znakowane fluorescencyjnie sondy ligowane do uniwersalnego startera z wykorzystaniem ligazy DNA. Stosuje się 16 sond, z których każda rozpoznaje dwa



kolejne nukleotydy. Pomiar powtarza się pięciokrotnie, każdorazowo wykorzystując starter z sekwencją przesuniętą o jeden nukleotyd. Długość odczytu wynosi 25-35 par zasad, a odczytywanie kolejnych zasad parami pozwala na dokładniejsze odróżnienie autentycznych polimorfizmów od błędów odczytu [30].

Po zakończeniu sekwencjonowania następuje etap składania (ang. *assembly*) polegający na rekonstrukcji genów i identyfikacji organizmów w oparciu o uzyskane dane. Istnieje wiele algorytmów do tworzenia pełnych sekwencji z otrzymanych z częściowo pokrywających się odczytów. W przypadku próbek metagenomicznych można zastosować dwie strategie: montaż *de novo* lub montaż oparty na referencji (ang. *co-assembly*). Najprostszymi algorytmami montażu *de novo* są algorytmy zachłanne (ang. *greedy algorithm*) dopasowujące fragmenty iteracyjnie, rozpoczynając od najbardziej pokrywających się i kończąc, gdy kolejne dopasowania nie są już możliwe. Oznacza to jednak, że dopasowania te mają charakter lokalny i nie biorą pod uwagę globalnych powiązań między odczytami, co może skutkować blokowaniem się procesu składania bądź nieprawidłowym złożeniem. Inne dostępne typy algorytmów *de novo* to „overlap-layout-consensus” (OLC) czy metody wykorzystujące wykres De Brujina (ang. *De Bruijn Graph*, DBG) [31]. Algorytm OLC jest trójetapowy. W pierwszej kolejności określa się stopień nakładania się otrzymanych odczytów, na podstawie których tworzone są układy odczytów przedstawiane na wykresie, z których wnioskuje się sekwencję najwyższej zgodności (sekwencja consensus) [31, 32]. Przy wykorzystaniu algorytmu DBG w pierwszej kolejności dzieli się uzyskane odczyty na mniejsze kilku nukleotydowe sekwencje, na podstawie których tworzy się wykres De Brujina, który następnie służy do stworzenia całkowitej sekwencji [32]. Montaż oparty jest na referencjach i wykorzystuje dostępne bazy zsekwencjonowanych genomów w celu przypasowania otrzymanych odczytów do istniejących sekwencji [31].

Finalnym etapem jest identyfikacja zsekwencjonowanych genów oraz organizmów. Istnieją dwie główne klasy metod służących do predykcji genów: metoda podobieństwa sekwencji oraz metoda sygnałowa, zwana także metodą *ab initio*. Pierwsza opiera się na założeniu, że regiony funkcyjne DNA są silniej zakonserwowane niż regiony niefunkcyjne, w związku z czym, geny spokrewnionych organizmów będą podobne. Na tej podstawie dopasowuje się otrzymaną sekwencję do sekwencji znanej, korzystając np. z programu BLAST. Metoda sygnałowa wykorzystuje zawarte w sekwencji sensory sygnałowe (ang. *signal sensors*) czyli krótkie motywy, takie jak kodony „start” i „stop”, regiony „splicing”, sekwencje punktów rozgałęzienia (ang. *branch points*) czy regiony polipirymidynowe. Wykorzystywane są także tzw. „sensory zawartości” (ang. *content sensors*), oparte o „dobór kodonów” (ang. *codon usage*), który jest unikatowy dla każdego gatunku i pozwalają ustalić sekwencje kodujące dzięki analizie statystycznej [33].

4. Zastosowanie metod metagenomicznych w badaniach mikrobiomu człowieka

Zaadoptowanie metod metagenomicznych w badaniu mikrobiomu człowieka pozwoliło na dokonanie wielu odkryć dotyczących relacji między stanem mikrobioty jelitowej człowieka a jego zdrowiem i kondycją. Badania metagenomowe pozwoliły na analizy jakościowe i ilościowe, które rzuciły światło na prawdziwe bogactwo drobnoustrojów jelitowych człowieka. Badania te umożliwiły również odkrycie związków

między jednostkami chorobowymi a stanem mikrobioty jelitowej, otwierając nowe możliwości w diagnostyce i terapii.

Podwaliny pod rozwój metagenomiki podłożyły projekty MetaHIT oraz Human Microbiome Project, które w sposób znaczący przyczyniły się do rozbudowania katalogu genów referencyjnych. W ramach projektu MetaHIT, na podstawie próbek kału pobranych od 124 Europejczyków, zidentyfikowano 3,3 miliona unikalnych genów, w przeważającej mierze należących do bakterii [5]. Amerykański Human Microbiome Project przeanalizował z kolei próbki od 242 osób, analizując nie tylko próbki fekalne, ale także z jamy ustnej, skóry, nosa i wagi w przypadku kobiet i przy użyciu sekwencjonowania 16S RNA ustalił jakie mikroorganizmy bytują w konkretnych niszach ekologicznych ludzkiego organizmu [34]. Badania ustaliły również, że ludzki mikrobiom jest w dużym stopniu zmienny między różnymi osobami, jednakże występuje pewien centralny mikrobiom odpowiedzialny za wiele ścieżek sygnałowych i metabolicznych. Mikrobiom członków tej samej rodziny jest również podobny [35]. Ustalono także, że mikrobiom człowieka jest stabilny w czasie [36].

Rozszerza się wiedza dotycząca związków między dysbiozą jelitową a występowaniem chorób. Przy użyciu metody „shotgun sequencing” zostały scharakteryzowane zmiany w składzie mikrobiota jelitowej i ścieżkach metabolicznych, które zachodzą przy dysbiozie związanej z chorobą Crohna. Poznanie składu mikrobiota w przypadku tej jednostki chorobowej może ułatwić jej zdiagnozowanie i daje wgląd w mechanizmy tej choroby [37]. Zmiany w mikrobiomie jelitowym powiązano również z zeszywniającym zapaleniem kręgosłupa [38], łuszczycą [39], a także z zakażeniem wirusem HIV [40], co wskazuje, że zmiany w mikrobiocie nie są jedynie powiązane z chorobami układu pokarmowego, lecz również z tymi dotykającymi innych tkanek i organów.

Choroby nowotworowe są jedną z najważniejszych chorób cywilizacyjnych obecnych czasów. Badania metagenomiczne pozwoliły na odkrycie powiązań między zmianami w mikrobiomie człowieka, a rozwojem nowotworów. Poprzez profilowanie metagenomiczne biopłatów powiązano występowanie raka żołądka z jego kolonizacją przez bakterię *H. pylori*. Odkryto również związek między dysbiozą mikroflory szyjki macicy ze zwiększonym ryzykiem infekcji spowodowanej wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV) [41], który już wcześniej został powiązany z ryzykiem wystąpienia nowotworu szyjki macicy [42]. W przypadku nowotworu jelita grubego zidentyfikowano powtarzalne biomarkery, które pozwalają na ocenę ryzyka jego wystąpienia i potencjalne działania prewencyjne [43].

Do grup chorób cywilizacyjnych należy również cukrzyca. W przypadku cukrzycy typu drugiego zidentyfikowano zmiany w potencjale metabolicznym mikrobiota jelitowej, które mogą przyczyniać się do jej rozwoju [44]. Zaproponowano również, że zaburzenie składu mikrobioty jelitowej polegające na zubożeniu bakterii produkujących maślan i mleczan przyczynia się do rozwoju cukrzycy typu I [45].

Metody metagenomiczne pozwalają także na rozszerzenie diagnostyki chorób. W zakażeniach układu moczowego drobnoustroje są zwykle identyfikowane poprzez posiew. Analiza metagenomiczna wskazała na potencjalne nowe patogeny związane z tą chorobą i może stanowić nowe podejście w diagnostyce tych zakażeń [46]. Badania wykazały również, że sekwencjonowanie nowej generacji jest czulsze niż metody klasyczne przy wykrywaniu patogenów, zwłaszcza występujących we krwi, płucach, oskrzelowo-pęcherzykowych i płwocinie [47]. Przy spadających kosztach sekwen-

cjonowania zaadaptowanie metod metagenomicznych w diagnostyce chorób mogło by pozwolić na bardziej spersonalizowaną pod pacjenta praktykę medyczną [48], bądź służyć do dobrania precyzyjnie spersonalizowanej diety [49]. Metody metagenomiczne mogą być również wykorzystane do optymalizacji preparatów probiotycznych. Porównanie profili metagenomicznych osób zdrowych i pacjentów z przerostem bakterii *Clostridium difficile*, pozwoliło na zidentyfikowanie potencjalnych bakterii działających osłonowo [50].

Badania wykazały również powiązania między mikrobiomem jelitowym a funkcjonowaniem centralnego układu nerwowego. Wykazano, że skład mikrobiomu jelitowego wpływa na działanie układu nagrody, będącego częścią układu limbicznego w mózgu i którego aktywacja wywołuje odczuwanie przyjemności, co może mieć duże znaczenie przy leczeniu uzależnień i otyłości. Powiązano również profile mikrobiomu jelitowego z zaburzeniami psychicznymi takimi jak depresja, czy zaburzenia lękowe [51]. Wykazano również powiązania między składem mikrobiomu jelitowego a cyklem dobowym. Wykazano korelację między chronotypem porannym i zwiększonym występowaniem bakterii z rodzaju *Alistipes* oraz między chronotypem wieczornym i zwiększonym występowaniem rodzaju *Lachnospira* [52].

5. Enterotypy jako nowa perspektywa patrzenia na ludzki mikrobiom

Wykorzystanie narzędzi metagenomicznych przyczyniło się do powstania teorii enterotypów w mikrobiocie jelitowej. Postuluje ona, że różnorodność mikrobioty jelitowej u ludzi nie ma charakteru ciągłego, lecz jest ograniczona do kilku wyraźnie różnych zbilansowanych stanów. W oparciu o podwyższony skład pewnych grup drobnoustrojów początkowo postulowano istnienie trzech enterotypów – Enterotyp I, bogaty w *Bacteroides* i inne bakterie pozyskujące energie głównie poprzez fermentację cukrów i proteolizę białek, Enterotyp II bogaty w *Prevotella* i *Desulfovibrio*, Enterotyp III, bogaty w *Ruminococcus*. Enterotypy te nie były zależne od czynników związanych z gospodarzem, ani nie różniły się bogactwem funkcji, jednak różny skład gatunkowy sugeruje wykorzystanie innych dróg produkcji energii na drodze fermentacji [53]. Wprowadzenie enterotypów pozwoliłoby ograniczyć liczbę zmiennych w określeniu bioróżnorodności mikrobiomu jelitowego, a to z kolei ułatwiłoby prowadzenie badań mikrobiologicznych, diagnostycznych czy terapii medycznej. Jednakże teoria wciąż budzi pewne kontrowersje i jest w trakcie weryfikacji. Obecne badania wydają się wskazywać, że enterotypy nie występują jako oddzielne kategorie z wyraźnymi granicami, lecz jako pewien gradient [54]. W szczególności istnienie enterotypu związanego z *Ruminococcus* wydaje się wątpliwe. Badania zdają się wykazywać istnienie jedynie dwóch enterotypów, jednego związanego z *Bacteroides* i *Ruminococcus* i drugiego związanego z *Prevotella* [54, 55].

Pojawiają się opinie, że występowanie określonych składowych enterotypów może z wynikać z zastosowanej metody obróbki danych i przy zmianie parametrów grupowania stają się one mniej wyraźne bądź zanikają. Kliniczne zastosowanie tego modelu wydaje się być również ograniczone i analiza konkretnych taksonów daje lepsze efekty [56], a opieranie się wyłącznie na enterotypach może ukrywać ważne wariacje w mikrobiomie [56, 57]. Jednakże analiza enterotypów może stanowić wspierający element w badaniach i terapii [57].

6. Podsumowanie

Od czasu izolacji pierwszych bakterii z ludzkiego przewodu pokarmowego, metody badań ludzkiego mikrobiomu uległy znacznemu rozwojowi. Odkrycia dokonane przy użyciu klasycznych metod mikrobiologicznych opartych na postulatach Kocha stanowiły podwaliny wiedzy o mikrobiomie człowieka, jednakże ich ograniczenia stały się z czasem bardzo wyraźne. Metody metagenomiczne, oparte na izolacji całkowitego DNA z próbki, jego sekwencjonowaniu i identyfikacji genów oraz organizmów na podstawie uzyskanej sekwencji, pozwoliły na znaczne rozszerzenie dostępnych ścieżek badań, wypełniły luki w wiedzy, i nakreśliły liczne związki między mikrobiomem człowieka a jego zdrowiem. Bardzo obiecujący jest szybki rozwój metod metagenomicznych. Nowo powstające techniki sekwencjonowania pozwalają na coraz szybszą analizę nawet długich fragmentów DNA, przy mniejszym ryzyku błędu oraz niższych kosztach, co znacznie zwiększa dostępność tych metod. Ulepszane są także obecne algorytmy analityczne pozwalając na analizę coraz bardziej złożonych próbek. Szybka rozbudowa dostępnych bibliotek metagenomicznych otwiera z kolei nowe ścieżki badawcze. W związku z tym należy się spodziewać dalszego postępu badań metagenomicznych, które rzucą nowe światło na skomplikowane relacje między mikrobiotą jelitową, a wieloma aspektami zdrowia człowieka. Lepsze zrozumienie tej symbiotycznej relacji pozwoli z kolei na lepsze poznanie nas samych.

Literatura

1. Kim G., Bae J., Kim M.J. i in., *Delayed Establishment of Gut Microbiota in Infants Delivered by Cesarean Section*, *Frontiers in Microbiology*, t. 11, nr September 2020, DOI: 10.3389/fmicb.2020.02099.
2. Neuman H., Koren O., *The Pregnancy Microbiome*, Nestle Nutrition Institute Workshop Series, t. 88, 2017, DOI: 10.1159/000455207.
3. Derrien M., Alvarez A.S., Vos W.M. de, *The Gut Microbiota in the First Decade of Life*, *Trends in Microbiology*, t. 27, nr 12, 2019, DOI: 10.1016/j.tim.2019.08.001,
4. Sender R., Fuchs S., Milo R., *Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body*, *PLoS Biology*, t. 14, nr 8, 2016, DOI: 10.1371/journal.pbio.1002533.
5. Qin J., Li R., Raes J. i in., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*, *Nature*, t. 464, nr 7285, 2010, DOI: 10.1038/nature08821.
6. Mohajeri M.H., Brummer R.J.M., Rastall R.A. i in., *The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications*, *European Journal of Nutrition*, t. 57, nr 1, 2018, DOI: 10.1007/s00394-018-1703-4, <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-018-1703-4>.
7. Proal A.D., Albert P.J., Marshall T.G., *The human microbiome and autoimmunity*, *Current opinion in rheumatology*, vol. 25,2, 2013, s. 234-40, DOI:10.1097/BOR.0b013e32835cedbf.
8. Stiemsma L.T., Michels K.B., *The Role of the microbiome in the developmental origins of health and disease*, *Pediatrics*, t. 141, nr 4, 2018, DOI: 10.1542/peds.2017-2437.
9. Borody T.J., Khoruts A., *Fecal microbiota transplantation and emerging applications*, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, t. 9, nr 2, 2012, DOI: 10.1038/nrgastro.2011.244, <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2011.244>.
10. Byrd A., Belkaid Y., Segre J., *The human skin microbiome*, *Nature Reviews Microbiology*, 16, 2018, s. 143-155, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.157>
11. Jones-Freeman B., Chonwerawong M., Marcelino V.R. et al., *The microbiome and host mucosal interactions in urinary tract diseases*, *Mucosal Immunology*, 14, 2021, s. 779-792, <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00372-5>.

12. Deo P.N., Deshmukh R., *Oral microbiome: Unveiling the fundamentals*, Journal of oral and maxillofacial pathology, 23(1), 2019, s. 122-128. doi:10.4103/jomfp.JOMFP.
13. Stewart E.J., *Growing unculturable bacteria*, Journal of Bacteriology, t. 194, nr 16, 2012, DOI: 10.1128/JB.00345-12.
14. Tang Q., Jin G., Wang G., Liu T., Liu X., Wang B., Cao H., *Current Sampling Methods for Gut Microbiota: A Call for More Precise Devices*, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, t. 10, nr April 2020, DOI: 10.3389/fcimb.2020.00151.
15. de Vos, Willem M., *Microbial biofilms and the human intestinal microbiome*, NPJ biofilms and microbiomes, vol. 1, 15005, 25 Mar. 2015, DOI:10.1038/npjbiofilms.2015.5.
16. Wooley J.C., Godzik A., Friedberg I., *A primer on metagenomics*, PLoS Computational Biology, t. 6, nr 2, 2010, DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000667.
17. Błędzki L., *Metoda porównania bogactwa gatunkowego i różnorodności gatunkowej. Część I*, Bioskop, 2007, s. 18-22.
18. Thomas T., Gilbert J., Meyer F., *Metagenomics – a guide from sampling to data analysis*, Microbial Informatics and Experimentation, t. 2, nr 1, 2012, DOI: 10.1186/2042-5783-2-3, <http://www.microbialinformaticsj.com/content/2/1/3>.
19. Alekseyev Y.O., Fazeli R., Yang S., Basran R., Maher T., Miller N.S., Remick D., *A next-generation sequencing primer – how does it work and what can it do?*, Academic Pathology, t. 5, 2018, DOI: 10.1177/2374289518766521.
20. Liu Y.X., Qin Y., Chen T., Lu M., Qian X., Guo X., Bai Y., *A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data*, Protein and Cell, t. 12, nr 5, 2021, DOI: 10.1007/s13238-020-00724-8.
21. Arnold J.W., Roach J., Azcarate-Peril M.A., *Emerging Technologies for Gut Microbiome Research*, Trends in Microbiology, t. 24, nr 11, 2016, DOI: 10.1016/j.tim.2016.06.008.
22. Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connel N., Alland D., *A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria*, Journal of Microbiological Methods, t. 69, nr 2, 2007, DOI: 10.1016/j.mimet.2007.02.005.
23. Quince C., Walker A.W., Simpson J.T., Loman N.J., Segata N., *Shotgun metagenomics, from sampling to analysis*, Nature Biotechnology, t. 35, nr 9, 2017, DOI: 10.1038/nbt.3935.
24. <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology.html> [data dostępu: 20.04.2022]
25. Bentley D., Balasubramanian S., Swerdlow H. et al., *Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry*, Nature 456, 2008, s. 53-59, DOI:10.1038/nature07517
26. <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/read-length.html> [data dostępu: 20.04.2022]
27. Stoler N., Nekrutenko A., *Sequencing error profiles of Illumina sequencing instruments*, NAR Genomics and Bioinformatics, t. 3, nr 1, 2021, DOI: 10.1093/nargab/lqab019.
28. Quail M.A., Smith M., Coupland P., Otto T.D., Harris S.R., Connor T.R., Bertoni A., Swerdlow H.P., Gu Y., *A tale of three NGS sequencing platforms*, „BMC Genomics”, t. 13, nr 341, 2012.
29. Rothberg J.M., Hinz W., Rearick T.M. i in., *An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing*, Nature, t. 475, nr 7356, 2011, DOI: 10.1038/nature10242.
30. Mardis E.R., *Next-generation DNA sequencing methods*, Annual Review of Genomics and Human Genetics, 9, 2008, s. 387-402, DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359.
31. Ghurye J.S., Cepeda-Espinoza V., Pop M., *Metagenomic assembly: Overview, challenges and applications*, Yale Journal of Biology and Medicine, t. 89, nr 3, 2016.
32. Li Z., Chen Y., Mu D., Yuan J., Shi Y., Zhang H., Gan J., Li N., Hu X., Liu B., Yang B., Fan W., *Comparison of the two major classes of assembly algorithms: Overlap-layout-*



- consensus and de-bruijn-graph*, Briefings in Functional Genomics, t. 11, nr 1, 2012, DOI: 10.1093/bfpg/elr035.
33. Wang Z., Chen Y., Li Y., *A brief review of computational gene prediction methods.*, Genomics, proteomics & bioinformatics / Beijing Genomics Institute, t. 2, nr 4, 2004, DOI: 10.1016/S1672-0229(04)02028-5.
34. Human Microbiome Project Consortium, *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*, Nature, t. 486, 7402, 13 Jun. 2012, s. 207-14, doi:10.1038/nature11234.
35. Turnbaugh P.J., Gordon J.I., *The core gut microbiome, energy balance and obesity*, Journal of Physiology, t. 587, nr 17, 2009, DOI: 10.1113/jphysiol.2009.174136.
36. Faith J.J., Guruge J.L., Charbonneau M., Subramanian S., Seedorf H., Goodman A.L., Clemente J.C., Knight R., Heath A.C., Leibel R.L., Rosenbaum M., Gordon J.I. *The long-term stability of the human gut microbiota*, Science (New York, N.Y.), t. 341, 6141, 2013, s. 1237439, DOI: 10.1126/science.1237439
37. Serrano-Gómez G., Mayorga L., Oyarzun I., Roca J., Borrueal N., Casellas F., Varela E., Pozuelo M., Machiels K., Guarner F., Vermeire S., Manichanh C., *Dysbiosis and relapse-related microbiome in inflammatory bowel disease: A shotgun metagenomic approach*, Computational and Structural Biotechnology Journal, t. 19, 2021, DOI: 10.1016/j.csbj.2021.11.037.
38. Chen Z., Zheng X., Wu X., Wu J., Li X., Wei Q., Zhang X., Fang L., Jin O., Gu J., *Adalimumab Therapy Restores the Gut Microbiota in Patients With Ankylosing Spondylitis*, Frontiers in Immunology, t. 12, nr September 2021, DOI: 10.3389/fimmu.2021.700570.
39. Xiao S., Zhang G., Jiang C., Liu X., Wang X., Li Y., Cheng M., Lv H., Xian F., Guo X., Tan Y., *Deciphering Gut Microbiota Dysbiosis and Corresponding Genetic and Metabolic Dysregulation in Psoriasis Patients Using Metagenomics Sequencing*, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, t. 11, nr April 2021, DOI: 10.3389/fcimb.2021.605825.
40. Bai X., Narayanan A., Nowak P., Ray S., Neogi U., & Sönnnerborg A., *Whole-Genome Metagenomic Analysis of the Gut Microbiome in HIV-1-Infected Individuals on Antiretroviral Therapy*, Frontiers in Microbiology, t. 12, nr June 2021, DOI: 10.3389/fmicb.2021.667718.
41. Gillet E., Meys J.F.A., Verstraelen H., Bosire C., De Sutter P., Temmerman M., Broeck D.V., *Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: A meta-analysis*, BMC Infectious Diseases, t. 11, nr 1, 2011, DOI: 10.1186/1471-2334-11-10, <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/11/10>.
42. Koshiol J., Lindsay L., Pimenta J.M., Poole C., Jenkins D., Smith J. S. ., *Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: A systematic review and meta-analysis*, American Journal of Epidemiology, t. 168, nr 2, 2008, DOI: 10.1093/aje/kwn036.
43. Thomas A.M., Manghi P., Asnicar F. i in., *Metagenomic analysis of colorectal cancer datasets identifies cross-cohort microbial diagnostic signatures and a link with choline degradation*, Nature Medicine, t. 25, nr 4, 2019, DOI: 10.1038/s41591-019-0405-7.
44. Dash N.R., Bataineh M.T. Al, *Metagenomic analysis of the gut microbiome reveals enrichment of menaquinones (Vitamin K₂) pathway in diabetes mellitus*, Diabetes and Metabolism Journal, t. 44, 2020, DOI: 10.4093/dmj.2019.0202.
45. Brown C.T., Davis-Richardson A.G., Giongo A., Gano K.A., Crabb D.B., Mukherjee N., Casella G., Drew J.C., Ilonen J., Knip M., Hyöty H., Veijola R., Simell T., Simell O., Neu J., Wasserfall C.H., Schatz D., Atkinson M.A., Triplett E.W., *Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes*, PLoS ONE, t. 6, nr 10, 2011, DOI: 10.1371/journal.pone.0025792.
46. Moustafa A., Li W., Singh H., Moncera K.J., Torralba M.G., Yu Y., Manuel O., Biggs W., Venter J.C., Nelson K.E., Pieper R., Telenti A., *Microbial metagenome of urinary tract infection*, Scientific Reports, t. 8, nr 1, 2018, DOI: 10.1038/s41598-018-22660-8.

47. Duan H., Li X., Mei A., Li P., Liu Y., Li X., Li W., Wang C., Xie S., *The diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in infectious diseases*, BMC Infectious Diseases, t. 21, nr 1, 2021, DOI: 10.1186/s12879-020-05746-5.
48. Miller R.R., Montoya V., Gardy J.L., Patrick D.M., Tang P., *Metagenomics for pathogen detection in public health*, Genome Medicine, t. 5, nr 9, 2013, DOI: 10.1186/gm485.
49. Iizuka K., Yabe D., *The role of metagenomics in precision nutrition*, Nutrients, t. 12, nr 6, 2020, DOI: 10.3390/nu12061668.
50. Amrane S., Hocquart M., Afouda P., Kuete E., Pham T.P.T., Dione N., Ngom I.I., Valles C., Bachar D., Raoult D., Lagier J.C., *Metagenomic and culturomic analysis of gut microbiota dysbiosis during Clostridium difficile infection*, Scientific Reports, t. 9, nr 1, 2019, DOI: 10.1038/s41598-019-49189-8.
51. García-Cabrerizo R., Carbia C., O’Riordan K.J., Schellekens H., Cryan J.F., *Microbiota-gut-brain axis as a regulator of reward processes*, Journal of Neurochemistry, t. 157, nr 5, 2021, DOI: 10.1111/jnc.15284.
52. Carasso S., Fishman B., Lask L. S., Shochat T., Geva-Zatorsky N., Tauber E., *Metagenomic analysis reveals the signature of gut microbiota associated with human chronotypes*, FASEB Journal, t. 35, nr 11, 2021, DOI: 10.1096/fj.202100857RR.
53. Arumugam M., Raes J., Pelletier E. i in., *Enterotypes of the human gut microbiome*, Nature, t. 473, nr 7346, 2011, DOI: 10.1038/nature09944.
54. Jeffery I.B., Claesson M.J., O’Toole P.W., Shanahan F., *Categorization of the gut microbiota: Enterotypes or gradients?*, Nature Reviews Microbiology, t. 10, nr 9, 2012, DOI: 10.1038/nrmicro2859.
55. Wu G.D., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K., Chen Y.Y., Keilbaugh S.A., Bewtra M., Knights D., Walters W.A., Knight R., Sinha R., Gilroy E., Gupta K., Baldassano R., Nessel L., Li H., Bushman F.D., Lewis J.D., *Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes*, Science, t. 334, nr 6052, 2011, DOI: 10.1126/science.1208344.
56. Knights D., Ward T.L., McKinlay C.E., Miller H., Gonzalez A., McDonald D., Knight R., *Rethinking enterotypes*, Cell Host and Microbe, t. 16, nr 4, 2014, DOI: 10.1016/j.chom.2014.09.013.
57. Costea P.I., Hildebrand F., Manimozhiyan A. i in., *Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition*, Nature Microbiology, t. 3, nr 1, 2017, DOI: 10.1038/s41564-017-0072-8.

Metody metagenomiczne w badaniu mikrobiomu jelitowego człowieka

Streszczenie

Metody metagenomiczne przyczyniły się w znaczący sposób do poznania mikrobiomu jelita człowieka i jego wpływu na zdrowie. Praca ta stanowi wprowadzenie do tematyki mikrobiomu ludzkiego, jego znaczenia i metod metagenomicznych. Omówiono nowe rozwiązania stosowane w eksperymentach metagenomicznych, ich zalety i wady w odniesieniu do metod hodowlanych. Metagenomika stanowi obecnie nieocenioną metodę w badaniach ludzkiego mikrobiomu, która pozwoli na wypełnienie licznych luk w wiedzy o ludzkiej mikrobiocie i jej zmienności.

Słowa kluczowe: metagenomika, mikrobiom

Metagenomic methods in the study of the human intestinal microbiome

Abstract

Metagenomic methods have greatly contributed to the understanding of human microbiome and the ways it affects the health of the host. This work serves as an introduction to the topic of the human microbiome, its importance and metagenomic methods. The solutions used in metagenomic methods have been discussed, along with the pros and cons in relation to classical methods. Currently metagenomics is an invaluable research method in the study of the human microbiome and an important tool in filling the gaps in our understanding of the human microbiota.

Keywords: metagenomics, microbiome

Ocena preparatu Parosin® w niechirurgicznym leczeniu zapalenia przyzębia na podstawie wybranych parametrów periodontologicznych

1. Wprowadzenie

Zapalenie przyzębia (ang. *periodontitis*) to przewlekła, wieloczynnikowa choroba zapalna, charakteryzująca się postępującą destrukcją struktur przyzębia. Głównym czynnikiem etiologicznym *periodontitis* jest płytka nazębna (biofilm bakteryjny) [1, 2]. Podatność na rozwój choroby zależy od rodzaju bakterii tworzących biofilm, a także od odpowiedzi immunologiczno-zapalnej organizmu i podlega stałej modyfikacji przez czynniki miejscowe i ogólne. Do klinicznych objawów choroby należy krwawienie dziąseł, obecność głębokich kieszonek przyzębnych, utrata przyczepu łącznotkankowego oraz widoczna na radiogramach utrata kości wyrostka zębodołowego. Zapalenie przyzębia jest obok próchnicy główną przyczyną utraty zębów. Wywiera negatywny wpływ na zdrowie pacjenta, prowadzi do dysfunkcji narządu żucia i upośledzenia estetyki twarzy [1, 2].

Podstawową metodą leczenia chorób przyzębia jest mechanoterapia – SRP (ang. *scaling and root planing*). Jej nadrzędnym celem jest usunięcie miękkich i twardych złogów z powierzchni korzenia, ograniczenie zapalenia dziąseł i redukcja głębokości kieszonek. Skuteczność mechanicznego usuwania złogów przy użyciu narzędzi ręcznych i urządzeń ultradźwiękowych może być jednak ograniczona w miejscach trudno dostępnych takich jak głębokie kieszonki przyzębne, ubytki kostne (zwłaszcza w obrębie furkacji), zachyłki stworzone przez nawisające wypełnienia i przekonturowane uzupełnienia protetyczne [3, 4]. Wyniki badań dotyczących skuteczności leczenia niechirurgicznego wskazują, że efektywność tych procedur można poprawić poprzez dodatkowe zastosowanie antyseptyków, antybiotyków, terapii fotodynamicznej czy laseroterapii [3, 5, 6].

Wśród wymienionych metod na szczególną uwagę zasługują preparaty antyseptyczne. Ich bazowe składniki (substancje czynne) cechuje zazwyczaj substancyjność, szerokie spektrum działania, zmniejszone ryzyko powstawania oporności bakteryjnej i relatywnie niskie koszty leczenia [2, 3]. Prawdopodobnie dlatego znalazły one miejsce w licznych protokołach rekomendowanych w leczeniu chorób przyzębia oraz patologii okołowszczepowych, m.in. w protokole: FMD (ang. *full-mouth disinfection*), LDD (ang. *local drug delivery*), CIST (ang. *cumulative interceptive supportive therapy*) [7-10]. Antyseptyki najczęściej stosowane w leczeniu chorób przyzębia to chlorheksydyna, olejki eteryczne, chlorek cetylopirydyny, jodopowidon, triklosan, a także fluorki i sole metali [2, 11-14].

Substancją aktywną wykorzystywaną w leczeniu infekcji jamy ustnej jest również bromek domifenu [15, 16]. Związek ten posiada właściwości emulgujące, obniża napięcie

¹ asu1@op.pl, Katedra i Zakład Periodontologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

międzyfazowe (skutecznie hamując adhezję bakterii do struktur przyzębia), a także wykazuje właściwości antyseptyczne dzięki działaniu podobnym do środków kationowych powierzchniowo czynnych [<https://go.drugbank.com/drugs/DB11594>]. Parosin® to preparat na bazie bromku domifenu przeznaczony do płukania kieszonek przyzębnych.

2. Cel pracy

Celem pracy była ocena preparatu Parosin® w leczeniu niechirurgicznym zapalenia przyzębia. miejscowe działanie preparatu analizowano na podstawie oceny ilościowej i jakościowej bakterii w kieszeniach przyzębnych.

3. Materiał i metody

Do badania klinicznego zakwalifikowano 70 pacjentów (w wieku od 35 do 60 roku życia) ze zdiagnozowanym zapaleniem przyzębia. Z grupy badanej wyłączono kobiety w ciąży, dzieci, a także osoby w podeszłym wieku. Dodatkowo, jako kryterium wykluczające przyjęto stwierdzenie (na podstawie danych klinicznych, wywiadu lub badania):

- alergii na materiały stomatologiczne;
- stosowania dodatkowych preparatów do higieny jamy ustnej (antyseptyki w postaci płukanek, maści);
- nadużywania alkoholu;
- rozpoczęcia leczenia periodontologicznego w innym gabinecie stomatologicznym pomiędzy wizytami składającymi się na fazę kliniczną badania;
- stosowania w okresie ostatnich 2 tygodni antybiotykoterapii ze wskazań miejscowych lub ogólnych.

Protokół badania klinicznego obejmował:

- I wizytę – podczas której wykonano badanie periodontologiczne, badanie mikrobiologiczne oraz leczenie niechirurgiczne.
- II wizytę (kontrolną po 7-14 dniach) – obejmującą badanie periodontologiczne i badanie mikrobiologiczne.

Protokół badania został zweryfikowany i zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Lublinie (numer KE-0254/306/2017). Wszyscy pacjenci zakwalifikowani do badania wyrazili świadomą zgodę na udział w badaniu. 19 pacjentów nie zgłosiło się na wizytę kontrolną. Ostatecznie grupa badana objęła 51 pacjentów (w tym 17 mężczyzn i 34 kobiety).

Do badania periodontologicznego wykorzystano podstawowy zestaw diagnostyczny oraz sondę periodontologiczną Hu-Friedy PCPUNC 15. Stan przyzębia badanych oceniono na podstawie wartości wybranych wskaźników i parametrów periodontologicznych API (ang. *Approximal Plaque Index*), mSBI (ang. *modified Sulcus Bleeding Index*), PD (ang. *Probing depth*) i CAL (ang. *Clinical attachment loss*). Parametry PD i CAL określano w czterech punktach pomiarowych przy każdym zębie. Wartości wskaźników API i mSBI zinterpretowano zgodnie z odpowiadającą im skalą (dla API: < 25% optymalna higiena jamy ustnej, 25-39% – w miarę dobra higiena jamy ustnej, 40-69% – higiena dostateczna, 70-100% – zła higiena jamy ustnej; dla MSBI: < 10% – klinicznie zdrowe dziąsła, 10-29% – zlokalizowane zapalenie dziąseł, 30-49% – uogólnione, umiarkowane zapalenie dziąseł, 50-100% – uogólnione, intensywne zapalenie dziąseł). Średnia wartość API przed leczeniem wyniosła 90,08%, średnia wartość wskaźnika mSBI wyniosła 72,54%.

Do badania mikrobiologicznego pobierano materiał z dwóch kieszonek przyzębnych (przy zębach jednoimiennych), dla których głębokość sondowania wynosiła minimum 5 mm ($PD \geq 5$ mm). Dla potrzeb badania wprowadzono określenia: „kieszonka reprezentatywna” (w której wykonano mechanoterapię oraz zastosowano preparat Parosin®; [SRP + antyseptyk]) i „kieszonka kontrolna” (w której wykonano tylko mechanoterapię; [SRP]) i „kieszonka kontrolna”. Po przeprowadzonym badaniu u każdego pacjenta wykonano skaling nad- i poddżąsłowy (SRP; *scaling and root planing*). Po zakończonej mechanoterapii kieszonkę reprezentatywną przepłukano preparatem Parosin®, a następnie ponownie pobrano wymazy z obu kieszonek przyzębnych. Po 7-14 dniach (podczas wizyty kontrolnej) dokonano powtórnej oceny parametrów periodontologicznych oraz pobrano wymazy do badania mikrobiologicznego. Ocena ilościowa i jakościowa bakterii w kieszonkach przyzębnych została przeprowadzona metodą oznaczano metodą qPCR (qPCR; *quantitative polymerase chain reaction*) z wykorzystaniem sond molekularnych (tab. 1).

Tabela 1. Mikrobiota kieszonek przyzębnych – ocena jakościowa bakterii metodą qPCR

Gen markerowy	Analizowane bakterie w wymazie
16S rRNA	Bakterie ogółem
hbpA	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
fus1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
fimA(I)	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
rpoB	<i>Prevotella intermedia</i>
hsp60	<i>Tannerella forsythia</i>
CfpA	<i>Treponema denticola</i>

Źródło: opracowanie własne. Badania przeprowadzone w ramach Projektu nr RPLU.01.02.00-06-0044/17.

Oceniono ogólną liczbę bakterii oraz wykonano oznaczenie ilościowe dla wybranych gatunków beztlenowych (Aa. – *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Pg. – *Porphyromonas gingivalis*; Td. – *Treponema denticola*; Tf. – *Tannerella forsythia*; Fn. – *Fusobacterium nucleatum*; Pi. – *Prevotella intermedia*).

3.1. Analiza statystyczna

W analizie statystycznej wyznaczono dwie jednostki przeliczeniowe (pacjent i kieszeń przyzębna). Dla cech ilościowych obliczono średnią arytmetyczną (M) oraz odchylenie standardowe (SD). Rozkład analizowanych cech oceniono testem W Shapiro-Wilka. Różnice dla cech ilościowych sprawdzono testem Wilcozona (przed leczeniem vs. 7-14 dni po leczeniu) oraz U Manna-Whitneya do oceny różnic mian analizowanych bakterii (porównanie schematów leczenia; skategoryzowane zmiany wartości PD i CAL). Różnice w częstości występowania analizowanych cech jakościowych (wyrażonych w postaci liczby i właściwego odsetka) między poszczególnymi grupami sprawdzono testem χ^2 . W pracy przyjęto 5% ryzyko błędu, zatem dla $p < 0,05$ różnice uznano za istotne statystycznie. Do obliczeń wykorzystano program Statistica 13 (StatSoft, Inc.).

4. Wyniki

Badanie mikrobiologiczne wykonane z wymazów pobranych na wizycie po 7-14 dniach po leczeniu wykazało istotnie statystycznie niższą ogólną liczbę bakterii w kieszonkach po skalingu i zastosowaniu preparatu Parosin® [SRP + antyseptyk] w porównaniu do kieszonek kontrolnych, w których nie zastosowano Parosinu® [SRP] (tab. 2).

Tabela 2. Ocena ilościowa bakterii w kieszeniach przyzębnych po leczeniu

	SRP (n = 51)		SRP + antyseptyk (n = 51)		p
	M	SD	M	SD	
Ogólna liczba bakterii	163312,9	201136,6	66015,73	119957,3	< 0,001
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	148,1	312,1	354,37	877,5	0,0505
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	42,8	140,9	17,37	56,5	0,3136
<i>Tannerella forsythia</i>	5785,2	14120,2	3568,33	6815,9	0,9860
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	7545,5	26864,2	2218,19	8966,5	0,5924
<i>Prevotella intermedia</i>	10447,9	32917,7	2809,13	9487,7	0,1000
<i>Treponema denticola</i>	1129,4	2771,5	325,98	641,3	0,9192

Źródło: opracowanie własne. Badania przeprowadzone w ramach Projektu nr RPLU.01.02.00-06-0044/17.

Zarówno dla kieszonek reprezentatywnych [SRP + antyseptyk], jak i kieszonek kontrolnych [SRP] stwierdzono istotną statystycznie poprawę parametrów PD oraz CAL (tab. 3).

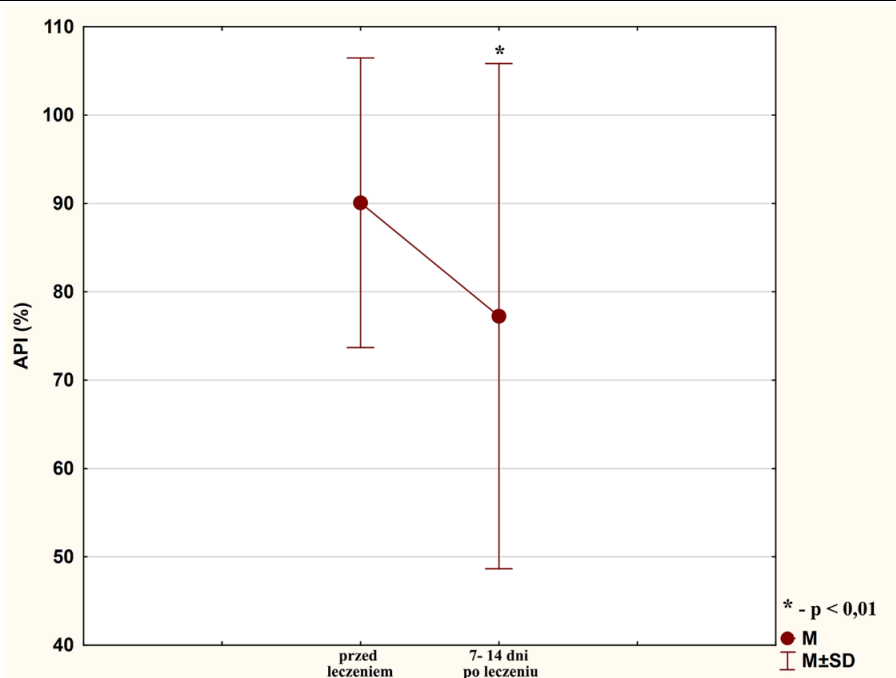
Tabela 3. Schemat leczenia a wybrane parametry periodontologiczne

			M	SD	p
SRP	PD (mm)	przed leczeniem	6,69	2,44	< 0,001
		7-14 dni po leczeniu	5,71	2,32	
	CAL (mm)	przed leczeniem	7,06	3,41	< 0,01
		7-14 dni po leczeniu	5,85	2,92	
SRP + antyseptyk	PD (mm)	przed leczeniem	7,40	2,21	< 0,001
		7-14 dni po leczeniu	6,29	2,60	
	CAL (mm)	przed leczeniem	7,91	3,05	< 0,001
		7-14 dni po leczeniu	6,86	3,75	

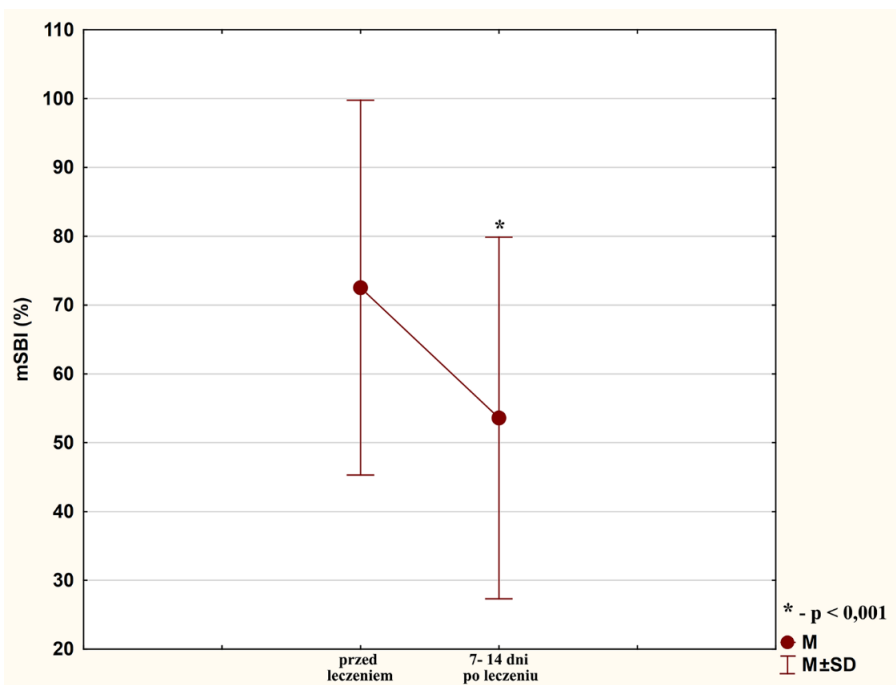
Źródło: opracowanie własne. Badania przeprowadzone w ramach Projektu nr RPLU.01.02.00-06-0044/17.

Uzyskane wartości wskaźnika API oraz mSBI po zastosowanym leczeniu wskazują na poprawę higieny jamy ustnej (mniejsza liczba przestrzeni międzyzębowych z płytką nazębną) i zmniejszenie stanu zapalnego dziąseł (redukcja krwawienia) (rys. 1-2).

Jako wykładnik klinicznej skuteczności zastosowanych schematów leczenia przyjęto: redukcję głębokości kieszeni przyzębnych (PD) oraz zmniejszenie utraty przyczepu łącnokankowego (odzysk CAL). Uzyskane wartości skategoryzowano, a zatem do grupy „redukcja” włączono przypadki, w których po 7-14 dniach po leczeniu odnotowano redukcję głębokości kieszeni przyzębnych lub zmniejszenie utraty przyczepu łącnokankowego. Natomiast przypadki, w których nie stwierdzono zmiany głębokości lub zwiększoną głębokość włączono do grupy „bez redukcji/brak poprawy”. Zastosowany schemat leczenia nie różnicował w sposób istotny statystycznie odsetka stwierdzonych redukcji głębokości dla kieszeni przyzębnych (tab. 4), jak i zmniejszenia utraty przyczepu łącnokankowego (tab. 5).



Rysunek 1. Wartość wskaźnika API – ocena higieny w przestrzeniach międzyzębowych u pacjentów poddanych niechirurgicznemu leczeniu zapalenia przyzębia [Źródło: opracowanie własne. Badania przeprowadzone w ramach Projektu nr RPLU.01.02.00-06-0044/17]



Rysunek 2. Wartość wskaźnika mSBI – ocena krwawienia u pacjentów poddanych niechirurgicznemu leczeniu zapalenia przyzębia [Źródło: opracowanie własne. Badania przeprowadzone w ramach Projektu nr RPLU.01.02.00-06-0044/17]

Tabela 4. Zastosowany schemat leczenia a skategoryzowana zmiana wartości PD kieszeni przyzębnych

	SRP		SRP + antyseptyk		p
	n	%	n	%	
redukcja PD (PD < od wartości wyjściowych)	26	50,98	30	58,82	0,4261
brak redukcji PD (PD ≥ od wartości wyjściowych)	25	49,02	21	41,18	

Źródło: opracowanie własne. Badania przeprowadzone w ramach Projektu nr RPLU.01.02.00-06-0044/17.

Tabela 5. Zastosowany schemat leczenia a skategoryzowana zmiana wartości utraty przyczepu łącznotkankowego

	SRP		SRP + antyseptyk		p
	n	%	n	%	
odzysk CAL (CAL < od wartości wyjściowych)	29	56,86	23	45,10	0,2347
brak poprawy CAL (CAL ≥ od wartości wyjściowych)	22	43,14	28	54,90	

Źródło: opracowanie własne. Badania przeprowadzone w ramach Projektu nr RPLU.01.02.00-06-0044/17.

Istotnie statystycznie większą ogólną liczbę bakterii oraz *Treponema denticola* stwierdzono przed rozpoczęciem leczenia w przypadkach, w których nie odnotowano poprawy PD po zastosowanym leczeniu. Dla pozostałych analizowanych bakterii nie odnotowano znamienych różnic – zarówno przed, jak i po leczeniu – w zależności od efektu klinicznego leczenia zapalenia przyzębia ocenianego na podstawie redukcji głębokości kieszeni przyzębnych (tab. 6).

Tabela 6. Skategoryzowana głębokość kieszeni przyzębnych po leczeniu a liczba bakterii

		redukcja PD (n = 56)		brak redukcji PD (n = 46)		p
		M	SD	M	SD	
przed leczeniem	Ogólna liczba bakterii	178998,5	291717,9	1140864	3289713	< 0,05
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	1226,5	5169,2	234	592	0,1775
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	23,9	84,2	19	44	0,2865
	<i>Tannerella forsythia</i>	8573,4	11797,4	19393	28021	0,0649
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4956,8	12366,3	10259	30055	0,3083
	<i>Prevotella intermedia</i>	3572,9	13999,4	7936	25647	0,6022
	<i>Treponema denticola</i>	583,5	1211,9	1569	3299	< 0,05
	Ogólna liczba bakterii	108314,2	175318,3	123365,6	170075,7	0,2392
7-14 dni po leczeniu	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	195,9	641,6	315,4	684,4	0,3304
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	34,3	121,6	25,3	89,9	0,5957
	<i>Tannerella forsythia</i>	4755,5	12292,7	4606,8	9666,9	0,7894
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	2401,3	8199,4	7917,6	28450,1	0,8688
	<i>Prevotella intermedia</i>	7001,3	25888,2	6266,1	23024,8	0,7201
	<i>Treponema denticola</i>	825,4	2406,7	619,4	1538,0	0,6154

Źródło: opracowanie własne. Badania przeprowadzone w ramach Projektu nr RPLU.01.02.00-06-0044/17.

Istotnie statystycznie większą ogólną liczbę bakterii stwierdzono przed rozpoczęciem leczenia w przypadkach, w których nie odnotowano poprawy CAL po zastosowanym leczeniu. Dla pozostałych analizowanych bakterii nie odnotowano znamienych różnic – zarówno przed, jak i po leczeniu – w zależności od efektu klinicznego leczenia zapalenia przyzębia ocenianego na podstawie poprawy przyczepu łącznotkankowego (tab. 7).

Tabela 7. Skategoryzowana poprawa przyczepu łącznotkankowego po leczeniu a liczba bakterii

		odzysk CAL (n = 52)		brak poprawy CAL (n = 50)		p
		M	SD	M	SD	
przed leczeniem	Ogólna liczba bakterii	450292,9	1362958	781768,2	2918989,0	< 0,05
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	1309,4	5359,0	227,1	572,0	0,2428
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	16,2	62,0	27,0	76,0	0,1445
	<i>Tannerella forsythia</i>	10691,3	16933,0	16324,8	24954,0	0,3301
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	8630,4	26667,0	6014,6	16492,0	0,6180
	<i>Prevotella intermedia</i>	3609,0	14424	7549,4	24683,0	0,4434
	<i>Treponema denticola</i>	749,5	1514,0	1317,2	3097,0	0,3186
7-14 dni po leczeniu	Ogólna liczba bakterii	118625,5	182134,8	111615,1	163339,5	0,6366
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	154,1	511,6	348,3	777,6	0,6366
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	35,8	126,3	24,5	86,3	0,7449
	<i>Tannerella forsythia</i>	3281,2	6797,1	6123,4	14184,4	0,3412
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5526,5	17350,6	4278,4	22883,0	0,5876
	<i>Prevotella intermedia</i>	5747,6	23868,5	7605,4	25355,4	0,7502
	<i>Treponema denticola</i>	646,3	2017,6	819,0	2101,1	0,2525

Źródło: opracowanie własne. Badania przeprowadzone w ramach Projektu nr RPLU.01.02.00-06-0044/17.

5. Dyskusja

Mechaniczne usuwanie złogów nazębnych (*scaling i root planing*) to standardowe postępowanie kliniczne w leczeniu chorób przyzębia. Badania dotyczące niechirurgicznego leczenia *periodontitis* wskazują, że mechanoterapia zmniejsza poziom zapalenia dziąseł, redukuje głębokość kieszonek przyzębnych oraz wpływa na kliniczną poprawę położenia przyczepu łącznotkankowego [17-19].

Kliniczną skuteczność skalingu nad- i poddziąsłowego potwierdzono również w badaniach własnych. Podczas wizyty kontrolnej stwierdzono zmniejszenie ilości płytki bakteryjnej w przestrzeniach międzyzębnych (istotnie statystycznie niższą wartość wskaźnika API) (rys. 1), zmniejszenie rozległości stanu zapalnego dziąseł (istotnie statystycznie niższą wartość wskaźnika mSBI w porównaniu z badaniem wstępnym; 72,54% vs. 53,59%; $p < 0,001$) (rys. 2), a także znamienne statystycznie poprawę parametrów PD i CAL (średnie PD „kieszonki reprezentatywnej” przed zabiegiem vs. po zabiegu: 7,40 vs. 6,29; $p < 0,001$; średnia PD "kieszonki kontrolnej" przed zabiegiem vs. po zabiegu: 6,69 vs. 5,71; $p < 0,001$), (średni CAL „kieszonki reprezentatywnej” przed zabiegiem vs. po zabiegu: 7,91 vs. 6,89; $p < 0,01$; średni CAL „kieszonki kontrolnej” przed zabiegiem vs. po zabiegu: 7,06 vs. 5,85; $p < 0,001$) (tab. 3).

Niechirurgiczne leczenie periodontologiczne wiąże się jednak z pewnymi ograniczeniami. Do ograniczeń tych należy zaliczyć trudną dostępność pola zabiegowego,

możliwość długotrwałego przetrwania głębokich kieszonek, ryzyko nawrotu choroby (niższa stabilność kliniczna), a także ograniczenia ze strony operatora i instrumentarium (niewystarczające czucie powierzchniowe, nieprawidłowo przygotowane – tępe – narzędzia ręczne) [3, 9, 17, 20].

Badania przeprowadzone przez Van der Weijdena i wsp. wykazały, że sukces leczenia niechirurgicznego może być limitowany przez nikotynizm oraz uwarunkowania anatomiczne obszaru objętego procesem chorobowym (tj. liczbę korzeni, zajęcie rejonu furkacji). Spośród 1182 pacjentów z zapaleniem przyzębia, u których przeprowadzono mechanoterapię, wyznaczony cel leczenia (PD \leq 5 mm, bez krwawienia przy sondowaniu) osiągnięto u 39% leczonych. Brak sukcesu terapeutycznego istotnie częściej stwierdzano przy zębach wielokorzeniowych, a także w przypadkach, w których procesem zapalnym objęty był obszar furkacji [4]. Autorzy wspomnianej pracy podkreślają również, że w przeprowadzonych przez nich badaniach nie uwzględniono wyjściowej głębokości kieszonki, co nie pozwala na analizę uzyskanych wyników w odniesieniu do tego parametru. W badaniach własnych stwierdzono natomiast, że wyjściowo statystycznie większa ogólna liczba bakterii występowała w tych kieszeniach, w których po leczeniu nie odnotowano redukcji PD i poprawy CAL. Kieszenie bez redukcji PD były również powiązane z wyjściowo wyższym mianem *Treponema denticola* (tab. 6 i 7).

Efekty leczenia niechirurgicznego, widoczne na poziomie klinicznym, są możliwe jedynie przy istotnym zmniejszeniu liczby bakterii w kieszonkach przyzębnych. Zmiany mikrobiologiczne opisywane po SRP dotyczą nie tylko zmniejszenia ogólnej liczby bakterii ale także spadku liczby bakterii szczególnie patogennych dla przyzębia (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*) [21]. Spadek ogólnej liczby bakterii po leczeniu niechirurgicznym odnotowano także w badaniach własnych. Spadek ten był istotnie statystycznie większy w kieszonkach, w których oprócz SRP zastosowano antyseptyk (tab. 2). Uzyskane wyniki potwierdzają zatem fakt, że skuteczność mechanoterapii można poprawić poprzez dodatkowe zastosowanie środków przeciwbakteryjnych (bakteriobójczych i bakteriostatycznych) [2, 3, 6, 9]. Miejscowa aplikacja tych środków wiąże się najczęściej z podaniem preparatów bezpośrednio do kieszonek przyzębnych, dzięki czemu stężenie leku po aplikacji znacznie przekracza minimalne stężenie hamujące (MIC; ang. *minimum inhibitory concentration*) i utrzymuje się na wysokim poziomie przez kilka tygodni [8, 9, 11]. W krótkotrwałych obserwacjach (zarówno w badaniach własnych i badaniach innych autorów), dodatkowe zastosowanie antyseptyków nie powoduje jednak istotnych korzyści w parametrach klinicznych (poprawy parametrów PD i CAL) w porównaniu z klasycznym SRP (tab. 4 i 5) [22, 23].

Miejscowe aplikowanie antyseptyku ma zastosowanie w przypadku ran przewlekłych, a zatem taki sposób wykorzystywany jest nie tylko w gabinecie stomatologicznym. Metoda taka pozwala na stosowanie mniejszych dawek, co oprócz prewencji zakażenia przekłada się na krótszy czas i koszty leczenia. Uwzględniając niską cytotoksyczność (badania cytotoksyczności preparatu Parosin® w warunkach in vitro/dyfuzyja na agarze zgodnie z PN-EN ISO 10993-5:2009, wykazały 1 stopień cytotoksyczności – słaba cytotoksyczność) dobrą tolerancję dla tkanek (brak szkodliwego oddziaływania na gojącą ranę), skuteczne usuwanie biofilmu miejscowe stosowanie preparatu u pacjentów z zapaleniem przyzębia może stać się metodą z wyboru.

6. Wnioski

Miejscowe stosowanie antyseptyku przyczynia się do ograniczenia płytki nazębnej. Poprawa stanu klinicznego ocenianego na podstawie zmniejszenia głębokości kieszeni przyzębnych, oraz zmniejszenia utraty przyczepu łącznotkankowego przemawiają za miejscowym stosowaniem antyseptyku w niechirurgicznym leczeniu zapaleń przyzębia.

Uwagi ogólne

Badanie zostało zrealizowane i sfinansowane w ramach Projektu nr RPLU.01.02.00-06-0044/17.

Literatura

1. Papapanou P.N., Sanz M., Buduneli N., Dietrich T., Feres M., Fine D.H., Flemmig T.F., Garcia R., Giannobile W.V., Graziani F., Greenwell H., Herrera D., Kao R.T., Kebschull M., Kinane D.F., Kirkwood K.L., Kocher T., Kornman K.S., Kumar P.S., Loos B.G., Machtei E., Meng H., Mombelli A., Needleman I., Offenbacher S., Seymour G.J., Teles R., Tonetti M.S.M., *Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*. Journal of Clinical Periodontology, 45(Suppl 20), 2018, s. 162-170.
2. Rajendiran M., Trivedi H.M., Chen D., Gajendrareddy P., Chen L., *Recent development of active ingredients in mouthwashes and toothpaste for periodontal diseases*, Molecules, 26(7), 2021 Apr, s. 2001.
3. Ramanauskaite E., Machiulskiene V., *Antiseptics as adjuncts to scaling and root planing in the treatment of periodontitis: a systematic literature review*, BMC Oral Health, 20, 2020, s. 143.
4. Van der Weijden G.A., Dekkers G.J., Slot D.E., *Success of non-surgical periodontal therapy in adult periodontitis patients: A retrospective analysis*. International Journal of Dental Hygiene, 17 (4), 2019 Nov, 309-317.
5. Sanz M., Teugheles W., Group A of European Workshop on Periodontology.: *Innovations in non-surgical periodontal therapy: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology*, Journal of Clinical Periodontology, 35 (8 Suppl), 2008 Sep, s. 3-7.
6. Marsh P.D., *Controlling the oral biofilm with antimicrobials*, Journal of dentistry, 38 Suppl 1, 2010 Jun, s. 11-15.
7. Eberhard J., Jepsen S., Jervoe-Storm P-M, Needleman I., Worthington H.V., *Full-mouth treatment modalities (within 24 hours) for chronic periodontitis in adults*, Cochrane Database of Systematic Review, 17 2015 (4), 2015 Apr, CD004622.
8. Hasan F., Ikram R., Adel A., Abbas A., Ain Bukhari Q.U., Asadullah K., *Treatment of periodontal diseases by the local drug delivery system using 1% chlorhexidine gel: A randomized clinical trial*, Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 34 (1), 2021 Jan, s. 41-45.
9. Szulc M., Zakrzewska A., Zborowski J., *Local drug delivery in periodontitis treatment: A review of contemporary literature*, Dental Medical Problems, 55 (3), Jul-Sep 2018, s. 333-342.
10. Smeets R., Henningsen A., Jung O., Heiland M., Hammacher Ch., Stein J.M., *Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis – a review*, Haed & face medicine, 10, 2014 Sep 3, s. 34.
11. Stahli A., Liakhova I., Cvikl B., Lussi A., Sculean A., Eick S., *Activity of chlorhexidine formulations on oral microorganisms and periodontal ligament fibroblasts*, Swiss dental journal, 131(9), 2021 Sep 6, s. 705-712.
12. Mao X., Auer D.L., Buchalla W., Hiller K.-A., Maisch T., Hellwig E., Al-Ahmad A., Cieplik F., *Cetylpyridinium chloride: Mechanism of action, antimicrobial efficacy in*

- biofilms, and potential risk of resistance*, Antimicrobial agents and chemotherapy, 64(8), 2020 Aug., s. 00576-20.
13. Suresh S., Manimegalai M., Sudhakar U., Sophia, *Comparison of efficacy of preprocedural rinsing with chlorhexidine and essential oil mouthwash in reducing viable bacteria in dental aerosols – a microbiological study*, International Journal of Contemporary Dentistry, 2, 6, 2011, s. 1-6.
 14. Kanagalingam J., Feliciano R., Hah J.H., Labib H., Le T.A., Lin J.-C., *Practical use of povidone-iodine antiseptic in the maintenance of oral health and in the prevention and treatment of common oropharyngeal infections*, International journal of clinical practice, 69(11), 2015 Nov, s. 1247-56.
 15. Scaglione F., Scarpazza G., Marchi E., Biella G., Fraschini F., *Evaluation of domifen bromide in the treatment of acute infectious oral diseases*, International journal of clinical pharmacology research, 3 (4), 1983, s. 261-264.
 16. Scaglione F., Coduri M., Nebuloni R., Fraschini F., *Activity and tolerability of domifen bromide in patients affected by acute infectious dental diseases: a double-blind placebo-controlled trial*, International journal of clinical pharmacology research, 3 (5), 1983, s. 357-361.
 17. Aimetti M., *Nonsurgical periodontal treatment*, International Journal of Esthetic Dentistry, 9(2), 2014, s. 251-267.
 18. Van der Weijden G.A., Timmerman M.F., *A systematic review on the clinical efficacy of subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis*, Journal of clinical periodontology, 29 Suppl 3, 2002, s. 55-71.
 19. Draby I., *Non-surgical management of periodontal disease*, Australian dental journal, 54, Suppl 1, 2009 Sep, s. 86-95.
 20. Drisko C.H., *Nonsurgical periodontal therapy*, Periodontology, 2000, 25, 2001, s. 77-88.c
 21. Haffajee A.D., Cugini M.A., Dibart S., Smith C., Kent R.L., Socransky S.S., *The effect of SRP on clinical and microbiological parameters of periodontal diseases*, Journal of clinical periodontology, 24 (5), 1997, s. 324-334.
 22. Pietruska M., *Miejscowa i ogólna farmakoterapia w leczeniu chorób przyzębia*, [w:] Pietruska M. (red.) *Regeneracja tkanek przyzębia*, Quintessence Publishing Polska, 2017, s. 79-84.
 23. Greenstein G., Research, Science and Therapy Committee of American Academy of Periodontology, *The role of supra- and subgingival irrigation in the treatment of periodontal diseases*, Journal of Periodontology, 76, 2005, s. 2015-2027.

Ocena preparatu Parosin® w niechirurgicznym leczeniu zapalenia przyzębia na podstawie wybranych parametrów periodontologicznych

Streszczenie

Wprowadzenie: Parosin® to preparat antyseptyczny na bazie bromku domifenu przeznaczony do płukania kieszeni przyzębnych.

Cel pracy: Celem pracy była ocena skuteczności preparatu Parosin® w leczeniu niechirurgicznym zapalenia przyzębia.

Materiał i metody: Badanie kliniczne przeprowadzono u 51 pacjentów ze zdiagnozowanym zapaleniem przyzębia. Stan przyzębia oceniono na podstawie wybranych parametrów periodontologicznych (API, mSBI, PD i CAL). Do badania mikrobiologicznego pobierano materiał z dwóch kieszonek przyzębnych: reprezentatywnej (niechirurgiczne leczenie obejmowało mechanoterapię i zastosowanie antyseptyku Parosin®) oraz kontrolnej (w której nie zastosowano preparatu Parosin®). Wymaz z kieszeni przyzębnych pobierano trzykrotnie: podczas pierwszej wizyty przed i po zastosowanym leczeniu oraz podczas wizyty kontrolnej (po 7-14 dniach). Ocenę ilościową i jakościową bakterii przeprowadzono metodą PCR.

Wyniki: Badanie mikrobiologiczne wykonane z wymazów pobranych na wizycie kontrolnej wykazało istotnie statystycznie niższą ogólną liczbę bakterii w kieszeniach po skalingu i zastosowaniu preparatu Parosin®. Klinicznie, zarówno dla kieszonek po skalingu, jak i po skalingu oraz zastosowaniu preparatu Parosin® stwierdzono znamienne poprawę PD oraz CAL.



Wnioski: Uzyskana redukcja liczby bakterii, głębokości kieszeni przyzębnych oraz zmniejszenie utraty przyczepu łącznotkankowego przemawiają za miejscowym stosowaniem antyseptyku w niechirurgicznym leczeniu zapaleń przyzębia.

Słowa kluczowe: choroby przyzębia, leczenie niechirurgiczne, miejscowe stosowanie antyseptyku

The efficacy of Parosin® in the non-surgical treatment of periodontitis based on selected periodontal parameters

Abstract

Introduction: Parosin® is a domiphenium bromide based antiseptic formulation for periodontal pocket rinsing.

Objective: The aim of this study was to evaluate the efficacy of Parosin® in the non-surgical treatment of periodontitis.

Material and methods: A clinical study was conducted in 51 patients diagnosed with periodontitis. Periodontal status was evaluated based on selected periodontal parameters (API, mSBI, PD and CAL). For microbiological examination, material was collected from two periodontal pockets: representative (non-surgical treatment included mechanotherapy and application of Parosin® antiseptic) and control (in which Parosin® was not applied). Periodontal pocket swabs were collected three times: during the first visit before and after the applied treatment and during the follow-up visit (after 7-14 days). Quantitative and qualitative evaluation of the bacterial flora was performed by PCR.

Results: Microbiological examination performed from swabs taken at the follow-up visit showed a statistically significantly lower total bacterial count in pockets after scaling and Parosin® application. Clinically, there was a significant improvement in PD and CAL for both the pockets after scaling and after scaling and application of Parosin®.

Conclusions: The resulting reduction in bacterial flora, depth of periodontal pockets, and reduction in loss of connective tissue attachment support the use of a topical antiseptic in the non-surgical treatment of periodontitis.

Keywords: periodontal diseases, non-surgical treatment, topical antiseptic application

Powrót do przeszłości: nowe życie starych leków w terapiach antynowotworowych dzięki wykorzystaniu nowoczesnych systemów ich dostarczenia

1. Wprowadzenie

Głównymi problemami, z którymi wciąż boryka się farmakoterapia są wysokie dawki terapeutyczne generowane przez przemiany farmakokinetyczne leków czy ich ograniczoną biodostępność, a ponadto ich niespecyficzne dostarczanie, które generuje skutki uboczne. Jednym z takich niepożądanych efektów jest polekowa dysfunkcja mitochondriów (MDF, ang. *mitochondrial dysfunction*) prowadząca do kwasicy mleczanowej, co skutkuje zwiększoną produkcją i akumulacją mleczanu [1]. Ze względu na to ograniczenie biguanidy, takie jak fenformina i buformina, zostały wycofane z użytku komercyjnego w większości krajów pod koniec lat 70. [2]. Z drugiej strony około 90% zatwierdzonych lub wycofanych leków mają wskazania drugorzędne. Co więcej, strategia ponownego wykorzystania znanych leków do nowych zastosowań (ang. *Drug repurposing*), nazywana również repozycjonowaniem czy też reprofilowaniem leków stała się punktem zwrotnym dla wielu terapii, w tym terapii onkologicznych. Wiele doniesień naukowych wskazuje na potencjalne działanie przeciwnowotworowe leków pierwotnie stosowanych jako przeciwbakteryjne, przeciwcukrzycowe i psychotropowe.

Jedną z obiecujących możliwości w tej dziedzinie jest podejście oparte na wpływie środków farmakologicznych na funkcję mitochondriów, zwłaszcza indukcja dysfunkcji mitochondriów. Mitochondria są atrakcyjnym celem w terapiach przeciwnowotworowych ze względu na ich centralną rolę w regulacji metabolizmu komórek oraz regulacji procesu apoptozy. Ponadto wiadomo, że mitochondria wpływają na wszystkie etapy ontogenezy, co dodatkowo podkreśla potencjał terapii antynowotworowych skupiających się na terapeutycznym celowaniu w metabolizm mitochondrialny [3, 4].

2. Wykorzystanie starych leków – teoria reprofilowania leków

Nowotwory pozostają jedną z głównych przyczyn zgonów w skali globalnej. Pomimo szybkiego postępu wiedzy i zrozumienia molekularnych podstaw nowotworzenia, wciąż brakuje nowej skutecznej terapii do ograniczenia onkogenezy. Wiele wysiłków kładzie się na optymalizację kosztów, czasu trwania i skuteczności leczenia. Stosuje się alternatywne strategie opracowywania leków, takie jak zmiana przeznaczenia istniejących leków, nowa formuła znanych leków lub ukierunkowane dostarczanie (w celu poprawy biodostępności i zmniejszenia skutków ubocznych).

Szansą w tej dziedzinie może być analiza znanych leków nienowotworowych pod kątem ich ewentualnego działania przeciwnowotworowego, a ponadto rozważenie wcześniej opracowanych leków wycofanych z rynku w przeszłości (DRS, ang. *Drug Repurposing Strategy*) [5, 6]. Różne choroby mają wspólne szlaki molekularne i cele

¹ jmilczar@cbmm.lodz.pl, Dział Chemii Bioganicznej, Centrum Badań Molekularnych PAN, www.cbmm.lodz.pl.

w komórce, co uprawnia do badania przesiewowego dużej liczby istniejących leków pod kątem konkretnego celu chorobowego. W poszukiwaniu wydajnych terapii przeciwnowotworowych pod uwagę bierze się leki o pierwotnych właściwościach przeciwkaszlowych, uspokajających, przeciwbólowych, przeciwgorączkowych, przeciwartretycznych, znieczulających, przeciwcukrzycowych, zwiotczających mięśnie, immunosupresyjnych, antybakteryjnych, przeciwpadaczkowych, kardioprotekcyjnych, przeciwnadciśnieniowych, wzmagających erekcję czy wzmacniających lub łagodzących skutki dusznicy bolesnej [7, 8]. W ostatnich latach w ramach strategii zmiany przeznaczenia leków (przeprofilowania leków, repozycjonowania) dużą wagę przywiązuje się do toksycznego wpływu środków farmakologicznych na dysfunkcję mitochondriów [9].

Wśród leków nienowotworowych o powiązanej toksyczności mitochondrialnej na uwagę zasługują biguanidy. Związki te należą do rodziny o strukturze składającej się z dwóch N-połączonych guanidyn. Najbardziej znanym przedstawicielem tej rodziny jest metformina (N,N-dimetylobiguanid), doustny konwencjonalny lek przeciwcukrzycowy stosowany w leczeniu cukrzycy typu 2. Jest to lek kationowy, przy kilkugramowej dziennej dawce wykazuje ugruntowaną skuteczność i niewielką toksyczność. Jednak istnieje wiele doniesień o kwasicy mleczanowej związanej z metforminą (MALA, ang. *Metformin-associated lactic acidosis*), zwykle wywołującej ostrą niewydolność nerek [10]. Dane literaturowe wskazują na duże zainteresowanie metforminą jako obiecującym środkiem terapeutycznym [11], szczególnie o szerokim działaniu przeciwnowotworowym [12, 13]. Metformina działa poprzez ingerencję w łańcuch oddychania mitochondrialnego, a głównym celem tego leku jest kompleks I mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów (ETC, ang. *Electron transport chain*). Oprócz ETC, do głównych celów molekularnych metforminy należy również adenozynowa kinaza białkowa aktywowana monofosforanem (AMPK, ang. *AMP-activated protein kinase*) i mechanistyczny cel kompleksu rapamycyny 1 (mTORC1) [14], [15]. Hamowanie mitochondrialnej dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (G3PDH), głównego czynnika przeniesienia elektronów do ETC oraz enzymu wymaganego do glukoneogenezy również opisano jako skutek działania tego dimetylobiguanidu [16]. Ponadto metformina w terapii pojedynczej lub skojarzonej z innymi lekami przeciwnowotworowymi stanowiła przedmiot wielu badań klinicznych (NCT03137186; NCT02360618; NCT01941953; NCT03017833; NCT01930864) [2].

Jednak metabolizowanie *in vivo* metforminy (wchłanianie oraz usuwanie) jak i jej działanie farmakologiczne znacząco wpływa na transportery błonowe, takie jak np. transportery kationów organicznych (OCTs, ang. *Organic cation transporters*), ze względu na ich kationową strukturę [17]. Niejednorodność ekspresji OCTs zwykle prowadzi do transportu metforminy do różnych tkanek przez różne transportery, a tym samym do niezadowalającej biodostępności po podaniu doustnym, a w konsekwencji do niezadowalającej skuteczności terapeutycznej [17, 18]. Aby osiągnąć niezależne od transporterów kationowych dostarczanie metforminy i możliwość jej skutecznego wykorzystania w walce z nowotworem bez skutków ubocznych, konieczne jest zastosowanie systemów dostarczania leków [18].

Inne biguanidy o działaniu przeciwcukrzycowym to fenformina (biguanid fenyloetylowy) i buformina (1-butylobiguanid), które zostały wycofane z rynku pod koniec lat 70. ze względu na dużą częstość występowania skutków ubocznych, takich jak kwasica mleczanowa i toksyczność mitochondrialna [19, 20]. Fenformina jest prawie

50 razy bardziej aktywna niż metformina, a mechanizm działania obu leków jest bardzo podobny, jednak ze względu na fakt wycofania fenforminy z użycia klinicznego jej potencjał antynowotworowy nie był badany [2]. Bridges i współpracownicy wykazali, że metformina, buformina i fenformina akumulują się w mitochondriach ssaków i wpływają na fosforylację oksydacyjną [21]. Ich toksyczność mitochondrialna i aktywność zaburzająca metabolizm mogą być przydatne w hamowaniu wzrostu guza, ale kluczowe jest ich bezpieczne dostarczenie do komórek nowotworowych, aby zapobiec skutkom ubocznym w komórkach prawidłowych. Dodatni ładunek tych cząsteczek generuje dodatni potencjał powierzchniowy błon fosfolipidowych i sprzyja ich akumulacji w macierzy mitochondriów. Biguanidy mogą zakłócać funkcjonowanie komórek nowotworowych poprzez wytwarzanie hipoglikemii, a także poprzez blokowanie kompleksu regulatorowego mTOR [2]. Większość informacji naukowych o fenforminie dotyczy jej zdolności do indukcji apoptozy, stresu komórkowego lub zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 [22, 23]. W porównaniu z metforminą fenformina jest większą cząsteczką hydrofobową, rozpuszczalną w tłuszczach. Fenformina nie wymaga żadnego białka transportowego, aby przejść przez błonę komórkową, ponieważ zawarta w niej grupa fenyloetylowa sprawia, że lek jest dobrze przepuszczany przez błonę, tym niemniej ze względu na większe ryzyko wystąpienia efektów ubocznych należy go również wprowadzać za pomocą systemu dostarczania leków. Ponadto najnowsze dane literaturowe sugerują, że również buformina może być stosowana w profilaktyce i leczeniu różnych nowotworów, samodzielnie lub w połączeniu z innymi lekami lub wraz z radioterapią [24-26].

Istnieje potrzeba uzyskania naukowych dowodów, dla potwierdzenia potencjalnego działania przeciwnowotworowego biguanidów w bezpiecznej i skutecznej terapii opartej na dostarczaniu leków. Dodatkowo, w świetle obecnej ogólnoswiatowej sytuacji pandemicznej, ponowne wykorzystanie znanych biguanidów jako środków przeciwwirusowych może być również nową strategią leczenia grypy, koronawirusa, małpiej ospy czy innych infekcji wirusowych [27, 28]. Najnowsze dane wskazują, że linezolid hamował tempo wzrostu guza nowotworowego, czemu towarzyszyła zwiększona autofagia. Zmniejszenie wzrostu guza jest również wzmacniane przez połączenie linezolidu z blokerami autofagii [29]. Dlatego też antybakteryjny linezolid daje nadzieję na nową terapię przeciwnowotworową. Nadzieję na skuteczne leczenie nowotworów, oprócz opracowywania systemów dostarczania leków i zmiany przeznaczenia znanych leków, dają również terapie skojarzone. Dobrym rozwiązaniem wydaje się być leczenie skojarzone wspomnianymi wyżej lekami zakłócającymi aktywność mitochondriów z lekami, znanymi jako inhibitory enzymów, takich jak hydrolazy, izomerazy, transferazy, które są niezbędne w procesie komórkowym. Jedną z tych opcji może być hamowanie topoizomerazy, co powoduje pęknięcia jedno- i dwuniciowe w łańcuchu DNA, prowadzące do apoptotycznej śmierci komórki [30].

W strategii zmiany przeznaczenia leków na terapię celującą na dysfunkcję mitochondriów obok biguanidów, antybiotyki wydają się być bardzo interesujące. Mogą one skutecznie wywoływać dysfunkcję mitochondriów, dzięki czemu hamują proliferację komórek nowotworowych [31, 32]. Linezolid jest antybiotykiem szczególnie aktywnym przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, z działaniami niepożądanymi takimi jak toksyczność wobec szpiku kostnego, neuropatia czy kwasica mleczanowa [33]. Oprócz zwiększonego ryzyka toksyczności mitochondrialnej antybiotyki ten ma rów-

niez słabą rozpuszczalność w wodzie. Wszystko razem wzięte kreuje tę cząsteczkę jako atrakcyjny obiekt dla nowoczesnej farmacji. W tym trendzie ostatnie badania wskazują na rozwój tematyki kokryształów linezolidu o zmodyfikowanych właściwościach termicznych, co może w przyszłości zaowocować opracowaniem systemów dostarczania linezolidów opartych na topieniu [34]. Stosowanie linezolidu jest ograniczone przez powiązaną toksyczność mitochondrialną; jednak celowane dostarczanie leków może doprowadzić do skutecznego leczenia nowotworów [35, 36].

Kwasy barbiturowe (BA) i tiobarbiturowe (TBA) oraz ich różne pochodne są bardzo ważnymi związkami w chemii, biologii i medycynie [37]. BA jest organicznym, nieaktywnym farmakologicznie związkiem o heterocyklicznym szkielecie pirymidynowym, który może tworzyć wiele różnych pochodnych zwanych barbituranami [38]. Pochodne kwasu barbiturowego pomimo działania przeciwdrgawkowego i psychotropowego mają szeroki zakres aktywności biologicznej, w tym działanie przeciwtleniające, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwzapalne i przeciwnowotworowe [39-41]. Opisano również analogi kwasu tiobarbiturowego (TBA) mające podobne właściwości i będące inhibitorami czynnika 1 indukowanego niedotlenieniem (HIF-1) [42].

Inhibitorowa aktywność wyżej wymienionych związków jest przypisana również wobec enzymów takich jak m.in. α -glukozydaza (EC 3.2.1.20), która hydrolizuje węglowodany w procesie produkcji energii metabolicznej, a ponadto bierze udział we wzroście guza, angiogenezie i metastazie, dlatego też hamowanie jej aktywności jest wskazane w terapiach antynowotworowych. Badania metodą dokowania molekularnego wykazały wiązanie ligandów TBA i hamowanie aktywności α -glukozydazy [43, 44]. Symulacje obliczeniowe wskazują również na możliwość hamowania aktywności tyrozylnazy za pomocą kwasu tiobarbiturowego [45]. Inny enzym, topoizomeraza DNA, odgrywa podstawową funkcję w biologii komórkowej i jest celem molekularnym dla różnych leków. Wśród rodziny barbituranów, merbaron (kwas 5-[N-fenylkarboksy-amido]-2-tiobarbiturowy) wykazuje działanie hamujące w stosunku do topoizomerazy DNA II (topo II) [46]. Ostatnio opisano również regulacje cargoszlaku sygnałowego NF- κ B za pomocą pochodnej BA [41]. Tak więc, powyższe odkrycia mogą również otworzyć drogę do terapii przeciwnowotworowej opartej na hamowaniu szlaku NF- κ B [47]. Ponadto toksyczność mitochondrialną wywołaną lekami odnotowuje się również dla barbituranów [48]. Dlatego, biorąc pod uwagę znaczenie BA i TBA dla chemii medycznej, projektowanie nowych systemów dostarczania leków uzupełnionych o ugrupowanie tiobarbiturowe wydaje się istotne. Dostarczanie leków przeciwnowotworowych do mitochondriów może również ominąć klasyczne szlaki oporności [35]. Co więcej, przełomowe odkrycie Otto Warburga podkreśla metaboliczne cechy guza komórki odbiegające od normalnych komórek. Jednak błędnie założono, że komórki nowotworowe nie mają funkcjonalnych mitochondriów czy też nie ulegają fosforylacji oksydacyjnej (OXPHOS), a glikolizie, aby dostarczyć ATP do komórki, nawet w obecności tlenu (glikoliza tlenowa). Większość komórek nowotworowych zawiera metabolicznie wydajne mitochondria ze względu na wysokie tempo proliferacji i konieczność dostarczania ATP i metabolitów pośrednich.

3. Nowe formułacje leków oraz systemy ich dostarczania

W zastosowaniach biomedycznych więcej uwagi zwraca się na skuteczne dostarczanie substancji zaburzających funkcjonowanie mitochondriów do mikrośrodowiska guza. W ostatnich latach badano układy kokryształzacji i dostarczania leków jako nowe

metody eksploatacji aktywnych składników farmaceutycznych (API) [49]. Z jednej strony odpowiednio zaprojektowane kokryształy zapewniają ekscytujące możliwości w przemyśle farmaceutycznym poprzez zmianę fizykochemicznych właściwości leków oraz poprawiają ich rozpuszczalność, stabilność i biodostępność [50]. Z drugiej strony, biodostępność aktywnych składników farmaceutycznych można poprawić poprzez dostarczanie leków za pomocą systemów, których działanie polega na kontroli i ukierunkowanym transporcie leku do komórek, utrzymywaniu stężenia leku w ramach poziomu terapeutycznego i zmniejszaniu skutków ubocznych [51].

3.1. Systemy dostarczenia leków

Nanocząsteczki mezoporowatej krzemionki (MSN), zatwierdzone przez Agencję ds. Żywności i Leków (FDA) posiadają szereg cech, które dają im przepustkę do szerokiego zastosowania biomedycznego jako nieorganiczne nanoonośniki. Ze względu na właściwości fizykochemiczne takie jak elastyczny rozmiar, możliwość funkcjonalizacji powierzchni, niską toksyczność i bardzo wysoką pojemność ładunkową, terapeutyczne zastosowanie MSN może być wielką szansą dla terapii przeciwnowotworowych opartych na dostarczaniu leków, w tym terapeutycznych kwasów nukleinowych [52]. Ponadto inżynieria chemiczna dająca możliwości manewru dotyczące powierzchni i wymiarów porów może znacząco usprawnić zastosowanie sieci MSN. Wśród nanostrukturalnych mezoporowatych materiałów krzemionkowych powszechnie stosowanych jako materiał nośny można znaleźć Mobil Crystalline Materials 41 (MCM-41) zsyntetyzowany przez Mobil Corporation w 1992 roku [53]. Wielkie zainteresowanie zaczęło się w roku 2001, kiedy Vallet-Regi i współpracownicy udokumentowali MCM-41 jako system dostarczania ibuprofenu [54]. Ten sześciokątny materiał 2D ma unikalne cechy, takie jak uporządkowana porowatość w mezoskali, zmienna wielkość porów, duża powierzchnia właściwa, pojemność adsorpcyjna i poziom powierzchniowych grup Si-OH, przez które może oddziaływać z różnymi grupami funkcyjnymi dostarczanej cząsteczki [55, 56]. MCM-41 i jego różne modyfikacje są często stosowanymi nośnikami dla ibuprofenu [57], aspiryny [58], naproksenu [59] czy doksorubicyny [60]. Co więcej, MCM-41 staje się potężnym narzędziem nie tylko ze względu swoją porowatą strukturę i wysoką ładowność, ale także dlatego, że krzemionka jest powszechnie uznawana za materiał bezpieczny (GRAS, ang. *Generally Recognized as Safe*) i biodegradowalny. MCM-41 jest dobrze tolerowany zarówno *in vitro*, jak również *in vivo* [61]. Mezoporowata krzemionka może dostać się do komórki poprzez powszechnie znany mechanizm endocytozy [62]. Jednak krytycznym czynnikiem jest zdolność systemu DDS (ang. *Drug delivery system*) do uwolnienia ładunku w określonym miejscu. Dobrze zaprojektowane i sfunkcjonalizowane nanocząsteczki są doskonałymi kandydatami do wykonania tego zadania. Dlatego wybór najbardziej odpowiedniego systemu celowania w komórki nowotworowe powinien uwzględniać właściwości fizykochemiczne nanocząstek z właściwościami biochemicznymi powierzchni błony komórek nowotworowych oraz mikrośrodowiska guza [63]. Uwalnianie leku może nastąpić w odpowiedzi na wyzwalacze endogenne i egzogenne. Wśród bodźców zewnętrznych można wyróżnić temperaturę, światło UV-VIS, pole magnetyczne czy czułość na ultradźwięki [64]. Z kolei bodźce wewnętrzne opierają się na różnicach biochemicznych między komórką zdrową a nowotworową, takich jak pH, aktywność i ekspresja białek, potencjał redoks oraz stężenie małych cząsteczek, takich jak glukoza czy ATP [65]. Bodźce endogenne

są wykorzystywane do celowania w komórki nowotworowe w celu poprawy selektywności i specyficzności leków. Strategie rozpoznawania celów oparte na aptamerach mogą stanowić wyzwanie dla dalszych badań [66]. Ponadto duża ilość grup Si-OH na powierzchni mezoporowatej krzemionki daje możliwość modyfikowania nośnika MSN za pomocą różnych ligandów kierunkujących. Ponadto, wraz z ładunkiem w postaci leków przeciwnowotworowych, MSN mogą przenosić m.in. barwniki fluorescencyjne do obrazowania komórek. Z chemicznego punktu widzenia proces ładowania danych API do MSN jest kluczem, który definiuje dalszą użyteczność i zastosowanie systemów API/MSN. Dany lek może występować na powierzchni sfunkcjonalizowanej mezoporowatej krzemionki bądź może zostać zamknięty w porach. Ponadto, ze względu na kontrolowaną wielkość porów i ich powierzchnię efektywne chemicznie ładowanie jest możliwe na drodze interakcji leków ze ściankami porów poprzez oddziaływanie van der Waalsa, wiązania wodorowe, wiązania elektrostatyczne czy nawet wiązania kowalencyjne [67]. W ciągu ostatnich lat opracowano szereg metod ładowania danego API do sieci MSN. Techniki ładowania leków do mezoporowatych nośników obejmują: metodę stapienia, metodę różnych rozpuszczalników organicznych (OSM, ang. *Organic solvent method*) i metodę początkowej impregnacji wilgoci (IWI, ang. *Incipient wetness impregnation*) [67, 68]. Ze względu na liczną grupę słabo rozpuszczalnych w wodzie leków (PWSD, ang. *Poorly water-soluble drugs*) dane literaturowe wskazują na techniki mokre (OSM i IWI) jako najczęściej stosowane metody [69].

Metody topienia obejmują ogrzewanie systemu mezoporowatego zawierającego lek powyżej temperatury topnienia leku. Jest to skuteczna metoda na zamknięcie leków w porach, przy czym główną jej wadą jest potencjalna degradacja leków [56, 67]. Druga metoda bazująca na rozpuszczalnikach organicznych polega na kilkugodzinnym mieszanii matrycy krzemionkowej z API. W kolejnym kroku zawiesina jest oddzielana od roztworu przez filtrację lub odwirowanie, a następnie krzemionka załadowana lekiem poddawana jest 24-godzinnemu suszeniu [70]. Główne wady metody OSM to niski współczynnik ładowania leków, utrata leku podczas procesu filtracji oraz długi czas przygotowania API/OSM [68]. Bardziej efektywną metodą ładowania API jest metoda IWI. Proces ten wykorzystuje stężony roztwór API, który jest dalej dodawany kroplami do MSN, co prowadzi do wytworzenia mokrego proszku. W tym podejściu rozpuszczalnik jest usuwany przez suszenie, a nie przez filtrację czy wirowanie jak w poprzedniej metodzie OSM [68]. Główną zaletą metody IWI jest łatwość kontrolowania ilości leku, która jest umieszczona w nośniku [71]. Metoda ta jest procedurą czasochłonną i ma nieco mniejszą skuteczność ładowania [67, 68]. Nowatorskim podejściem jest również metoda załadunku API do mezoporowatych nanocząstek krzemionki nazywana DiSupLo (ang. *Diffusion Supported Loading*) [69]. Ta ostatnia technika wprowadzania API do porów krzemionki uzupełnia istniejące metody i znacznie rozszerza zastosowanie MSN w systemach wielolekowych. Metoda DiSupLo wykorzystuje i wzmacnia zalety technik mokrych i eliminuje ich wady, takie jak konkurencja między API a rozpuszczalnikiem w procesie początkowej impregnacji wilgoci [56]. DiSupLo jest prostą metodą i opiera się na ładowaniu leku w lokalizacji blisko porów MSN. Lek się lokalnie rozpuszcza w minimalnej objętości rozpuszczalnika i transportowane do porów. W procesie tym zaangażowane są stałe, ciekłe i gazowe stany API, MSN oraz rozpuszczalników. DiSupLo to metoda ilościowa, której główną zaletą



jest wyższy współczynnik wypełnienia w porównaniu do techniki mokrych (OSM lub IMI). Co więcej, DiSupLo jest łatwą, wydajną i mniej czasochłonną techniką w porównaniu do innych metod ładowania [69].

Będąc przy tematyce systemów dostarczania leków należy również zwrócić uwagę na nośniki jakimi mogą być pewne grupy wirusów, zwanych wirusami onkolitycznymi. O możliwości replikacji wirusów w komórkach nowotworowych wiadomo już od dawna. Pierwsze doniesienia dotyczące potencjału przeciwnowotworowego wirusów pochodzą z 1912 r. Jako pierwszy przypadek remisji guza pod wpływem działania wirusa udokumentował włoski ginekolog Nicola De Pace. U swojej pacjentki zaobserwował regresję nowotworu szyjki macicy po podaniu jej atenuowanej szczepionki przeciw wściekliznie [72]. Wielodekadowe już zainteresowanie wirusami onkolitycznymi zaowocowało zatwierdzoną przez FDA oraz Europejską Agencję Leków (EMA) immunoterpią T-VEC w leczeniu czerniaka skóry. Wirusy onkolityczne wykazują działanie wielokierunkowe, oprócz „ataku” na komórki nowotworowe indukują układ odpornościowy do walki z nowotworem [73]. Wirusy onkolityczne to wirusy, które mają ogromny potencjał do zabijania komórek nowotworowych oszczędzając przy tym komórki prawidłowe. O wykorzystaniu wirusów jako czynników przeciwnowotworowych zdecydował głównie ich naturalny tropizm do komórek określonych tkanek i narządów. Tropizm tkankowy – zjawisko polegające na selektywnym wyborze tkanki przez wirusa, które jest przyczyną atakowania określonych komórek przez ten rodzaj patogenów. Tropizm tkankowy wynika z faktu istnienia białek wiążących specyficzne dla danej tkanki receptory komórkowe [72]. Dodatkowo, wirusy onkolityczne mogą być nośnikiem chemioterapeutyków wyłącznie do komórek zmienionych nowotworowo. Ten typ terapii przeciwnowotworowej wykorzystuje genetycznie zmodyfikowane lub naturalnie występujące wirusy, które selektywnie replikują się w komórkach nowotworowych [74].

3.2. Kokryształizacja – nowa forma formulacji leków

Jak wspomniano wcześniej, oprócz systemów dostarczania leków, modyfikacją właściwości fizykochemicznych dla lepszej rozpuszczalności i biodostępności leków jest kokryształizacja. Kokryształy farmaceutyczne są cenne ze względu na poprawę właściwości fizykochemicznych leków bez uszczerbku dla ich korzyści terapeutycznych [75]. Ogólnie rzecz biorąc, kokryształy są materiałami krystalicznymi składającymi się z dwóch lub więcej różnych składników w pojedynczej postaci krystalicznej. W przypadku kokryształów farmaceutycznych jednym składnikiem jest API, a drugi składnik to koformer (zdolny do formowania uporządkowanych struktur bryłowych) [76]. Dla już istniejących kandydatów nowa formuła, poprzez inżynierię krystaliczną i techniki supramolekularne, oferuje nową drogę [77]. Niska rozpuszczalność leków zaburza procesy wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania (ADME, ang. *Administration, Distribution, Elimination, Metabolism and Elimination*), a tym samym tworzenie kokryształów daje możliwość przezwyciężyć te ograniczenia. Odpowiednio zaprojektowane kokryształy mogą zwiększać biodostępność leku. Kilka kokryształów zostało z powodzeniem wprowadzonych do użytku komercyjnego w ostatniej dekadzie [75]. Wśród nich są: Steglatro® (cząsteczkowy kokryształ ertugliflozyny i kwasu L-piroglutaminowego), Odomzol® (kokryształ sonidegibu i kwasu fosforowego), Suglat®

(kokryształ ipragliflozyny i L-proliny) oraz Entresto¹® (kokryształ walsartanu i sakubitrylu) [75, 78].

Procesy tworzenia kokryształu można ogólnie podzielić na metody oparte na stanie stałym lub na stanie ciekłym. Pierwszy typ charakteryzuje się bardzo niskim lub zerowym wykorzystaniem rozpuszczalnika. Drugi wiąże się z użyciem bardzo dużego nadmiaru rozpuszczalnika, a ponadto w kolejnym etapie, polega na oddzieleniu krystalicznego produktu od mieszanin [79]. Spośród wszystkich znanych metod formułowania kokryształów na uwagę zasługuje metod „młyna kulowego”. Do głównych zalet szlifowania elementów stałych w kuli można zaliczyć zmniejszenie wymaganego czasu reakcji oraz walory ekonomiczne i ekologiczne (nie wymaga nadmiaru toksycznych rozpuszczalników) [80].

4. Terapie skojarzone – wpływ systemów dostarczania leków na terapeutyczne zastosowanie leków o zmienionym przeznaczeniu

Powszechnie znane leki przeciwcukrzycowe czy przeciwbakteryjne wykazują także aktywności przeciwnowotworową, a ich zastosowanie w terapii skojarzonej z mezoporowatym dostarczaniem w systemach krzemionkowych „pozwolają na” skuteczniejszą terapię nowotworową. Z kolei mając na uwadze stronę związaną z testowanymi lekami, ich skutki, jak również wycofanie niektórych leków (np. biguanidów) z rynku, mogą stanowić potencjalny kierunek rozwoju poprzez ich dostarczanie tych leków za pomocą mezoporowatej krzemionki lub nośników wzbogaconych o konkretny cel uwalniania i wydają się być właściwą drogą do dalszych poszukiwań. Dobrze zaprojektowany i sfunkcjonalizowany DDSs pokazuje, że nanocząstki są doskonałymi narzędziami do wykonania tego zadania. Systemy dostarczania leków z efektywnymi substancjami hamują procesy zmian komórkowych towarzyszące patofizjologii nowotworów. Dlatego rozwój strategii dostaw kontrolowanych może prowadzić do znaczących korzyści w klinicznym zastosowaniu tych leków.

Nanocząstki są doskonałymi przykładami systemów dostarczania w repozycjonowaniu leków. Ponowne zastosowanie leków przeciwzapalnych takich jak m.in. ibuprofen jako środków przeciwnowotworowych (nowotwór żołądka, mózgu, piersi, okrężnicy) opierało się na zastosowaniu DDSs w celu ukierunkowanego dostarczenia leku do komórek nowotworowych [81]. Metformina, lek przeciwcukrzycowy, została również przedstawiona jako część terapii skojarzonej z doksorubicyną poprzez zastosowanie nanocząsteczek jako nośnika środka przeciwzapalnego i przeciwnowotworowego. Micelarna formuła środka przeciwcukrzycowego, metforminy, w połączeniu z lekiem przeciwnowotworowym, paklitakselem, przyczyniła się do leczenia przerzutów nowotworu sutka [80]. Godnym uwagi przykładem jest skupienie się na lekach przeciwhiperlipidemicznych z klasy statyn, których wpływ na gojenie złamań kości może być skutecznie wykorzystany tylko dzięki odpowiednim systemom dostarczania leków [82].

5. Wnioski/Podsumowanie

Synergizm działania leków antybakteryjnych, przeciwcukrzycowych czy psychotropowych jako leków przeciwnowotworowych – korzyści z formułowania w systemy dostarczania leków oparte m.in. na mezoporowatej krzemionce. Skuteczność tego połączenia może być wstępem do rozwoju nowoczesnych terapii celowanych. Ponadto kombinacja aktywnych składników otwiera drzwi dla nowoczesnej farmacji, do tworzenia

np. kokryształów farmaceutycznych w połączeniu z nośnikiem, jakim jest mezoporowata krzemionka. Pomimo wielkiego postępu i rozwoju obszaru DDSs, wciąż daleka jest droga do w pełni funkcjonalnego formułowania konwencjonalnych leków do nowych zastosowań. Należy tutaj uwzględnić kilka ważnych kwestii, takich jak biokompatybilność materiałów nośnych, obniżenie kosztów leczenia, poprawa skuteczności i selektywności dostarczania. Leczenie nowotworu oparte na systemach dostarczaniu leków ze specyficzną indukcją dysfunkcji mitochondriów jest nadzieją dla rozwoju nowoczesnych terapii celowanych. Wiedza na temat chorób nowotworowych jest dość obszerna, jednak nie na tyle, aby skutecznie z nimi walczyć. Powstrzymanie tej śmiertelnej choroby jest wciąż ważnym wyzwaniem dla naukowców, a połączenie strategii ponownego wykorzystania starych leków z nowoczesnymi systemami ich dostarczania budzi nadzieję zarówno badaczy jak i chorych.

Grant Narodowego Centrum Nauki Miniatura 2021/05/X/ST4/01145 (Suwara Justyna).

Literatura

1. Pham A.Q., Xu L.H., Moe O.W., *Drug-Induced Metabolic Acidosis*, F1000Res, 2015 Dec 16, 4, F1000 Faculty Rev-1460.
2. García Rubiño M.E., Carrillo E., Ruiz Alcalá G., Domínguez-Martín A., Marchal J., Boulaiz H., *Phenformin as an Anticancer Agent: Challenges and Prospects*, International journal of molecular sciences, 20(13), 2019, 3316.
3. Porporato P.E., Filigheddu N., Pedro J.M.B., Kroemer G., Galluzzi L., *Mitochondrial metabolism and cancer*, Cell Res., 28(3), 2018 Mar, s. 265-280.
4. Tomita K., Kuwahara Y., Igarashi K., Roudkenar M.H., Roushandeh A.M., Kurimasa A., Sato T., *Mitochondrial Dysfunction in Diseases, Longevity, and Treatment Resistance: Tuning Mitochondria Function as a Therapeutic Strategy*, Genes (Basel), 12(9), 2021 Aug 29, 1348.
5. Antoszczak M., Markowska A. Markowska J., Huczynski A., *Old wine in new bottles: Drug repurposing in oncology*, Eur J Pharmacol., 866, 2020 Jan 5, 172784.
6. Orecchioni S., Roma S., Raimondi S., Gandini S., Bertolini F., *Identifying Drug Repurposing Opportunities in Oncology*, Cancer J., 25(2), 2019 Mar/Apr, s. 82-87.
7. Gupta S.C., Sung B., Prasad S., Webb L.J., Aggarwal B.B., *Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs*, Trends Pharmacol Sci., 34(9), 2013 Sep, s. 508-517.
8. Nowak-Sliwinska P., Scapozza L., Ruiz, Altaba A., *Drug repurposing in oncology: Compounds, pathways, phenotypes and computational approaches for colorectal cancer*, Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 1871(2), 2019 Apr, s. 434-454.
9. Stoker M.L. et al., *Impact of pharmacological agents on mitochondrial function: a growing opportunity?*, Biochem Soc Trans., 47(6), 2019 Dec 20, s. 1757-1772.
10. Wang G.S., Hoyte C., *Review of Biguanide (Metformin) Toxicity*, J Intensive Care Med., 34(11-12), 2019 Nov-Dec, s. 863-876.
11. Wang Y.W., He S.J., Feng X., Cheng J., Luo Y.T., Tian L., Huang Q., *Metformin: a review of its potential indications*, Drug Des Devel Ther., 11, 2017 Aug 22, s. 2421-2429.
12. Samuel S.M., Varghese E., Kubatka P., Triggle C.R., Büsselberg D., *Metformin: The Answer to Cancer in a Flower? Current Knowledge and Future Prospects of Metformin as an Anti-Cancer Agent in Breast Cancer*, Biomolecules, 9(12), 2019 Dec 9, s. 846.
13. Yu H., Zhong X., Gao P., Shi J., Wu Z., Guo Z., Wang Z., Song Y., *The Potential Effect of Metformin on Cancer: An Umbrella Review*, Front Endocrinol (Lausanne), 10, 2019 Sep 18, s. 617.



14. Pryor R., Cabreiro F., *Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets*, *Biochem J.*, 471(3), 2015 Nov 1, s. 307-22.
15. Vancura A., Bu P., Bhagwat M., Zeng J., Vancurova I., *Metformin as an Anticancer Agent*, *Trends Pharmacol Sci.*, 39(10), 2018 Oct, s. 867-878.
16. Madiraju A.K., Erion D.M., Rahimi Y., Zhang X.M., Braddock D.T., Albright R.A., Prigaro B.J., Wood J.L., Bhanot S., MacDonald M.J., Jurczak M.J., Camporez J.P., Lee H.Y., Cline G.W., Samuel V.T., Kibbey R.G., Shulman G.I., *Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase*, *Nature*, 510(7506), 2014 Jun 26, s. 542-6.
17. Liang X., Giacomini K.M., *Transporters Involved in Metformin Pharmacokinetics and Treatment Response*, *J Pharm Sci.*, 106(9), 2017 Sep, s. 2245-2250.
18. Chen Y., Shan X., Luo C., He Z., *Emerging nanoparticulate drug delivery systems of metformin*, *J. Pharm. Investig.*, 50, 2020, s. 219-230.
19. Luft D., Schmülling R.M., Eggstein M., *Lactic acidosis in biguanide-treated diabetics: a review of 330 cases*, *Diabetologia*, 14(2), 1978 Feb, s. 75-87.
20. Chan N.N., Brain H.P., Feher M.D., *Metformin-associated lactic acidosis: a rare or very rare clinical entity?*, *Diabet Med.*, 16(4), 1999 Apr, s. 273-81.
21. Bridges H.R., Jones A.J., Pollak M.N., Hirst J., *Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria*, *Biochem J.*, 462(3), 2014 Sep 15, s. 475-87.
22. Jackson A.L., Sun W., Kilgore J., Guo H., Fang Z., Yin Y., Jones H.M., Gilliam T.P., Zhou C., Bae-Jump V.L., *Phenformin has anti-tumorigenic effects in human ovarian cancer cells and in an orthotopic mouse model of serous ovarian cancer*, *Oncotarget*, 8(59), 2017 Oct 24 s. 100113-100127.
23. Veiga S.R., Ge X., Mercer C.A., Hernández-Álvarez M.I., Thomas H.E., Hernandez-Losa J., Ramón Y Cajal S., Zorzano A., Thomas G., Kozma S.C., *Phenformin-Induced Mitochondrial Dysfunction Sensitizes Hepatocellular Carcinoma for Dual Inhibition of mTOR*, *Clin Cancer Res.*, 24(15), 2018 Aug 1, s. 3767-3780.
24. Kilgore J., Jackson A.L., Clark L.H., Guo H., Zhang L., Jones H.M., Gilliam T.P., Gehrig P.A., Zhou C., Bae-Jump V.L., *Buformin exhibits anti-proliferative and anti-invasive effects in endometrial cancer cells*, *Am J Transl Res.*, 8(6), 2016 Jun 15, s. 2705-15.
25. Li J., Chen L., Liu Q., Tang M., Wang Y., Yu J., *Buformin suppresses proliferation and invasion via AMPK/S6 pathway in cervical cancer and synergizes with paclitaxel*, *Cancer Biol Ther.*, 19(6), 2018 Jun 3, s. 507-517.
26. Yakisich J.S., Azad N., Kaushik V., Iyer A.K.V., *The Biguanides Metformin and Buformin in Combination with 2-Deoxy-glucose or WZB-117 Inhibit the Viability of Highly Resistant Human Lung Cancer Cells*, *Stem Cells Int.*, 2019, 2019 Feb 21, 6254269.
27. Khadka S., Yuchi A., Shrestha D.B., Budhathoki P., Al-Subari S.M.M., Ziad Alhouzani T.M., Anwar Butt I., *Repurposing Drugs for COVID-19: An Approach for Treatment in the Pandemic*, *Altern Ther Health Med.*, 26(S2), 2020 Aug, s. 100-107.
28. Sahoo B.M., Ravi Kumar B.V.V., Sruti J., Mahapatra M.K., Banik B.K., Borah P., *Drug Repurposing Strategy (DRS): Emerging Approach to Identify Potential Therapeutics for Treatment of Novel Coronavirus Infection*, *Front Mol Biosci.*, 8, 2021 Feb 26, 628144.
29. Abad E., García-Mayea Y., Mir C., Sebastian D., Zorzano A., Potesil D., Zdrahal Z., Lyakhovich A., Leonart M.E., *Common Metabolic Pathways Implicated in Resistance to Chemotherapy Point to a Key Mitochondrial Role in Breast Cancer*, *Mol Cell Proteomics*, 18(2), 2019 Feb, s. 231-244.
30. Ganesan K., Xu B., *Telomerase Inhibitors from Natural Products and Their Anticancer Potential*, *Int J Mol Sci.*, 19(1), 2017 Dec 21, s. 13.
31. Kalghatgi S., Spina C.S., Costello J.C., Liesa M., Morones-Ramirez J.R., Slomovic S., Molina A., Shirihai O.S., Collins J.J., *Bactericidal antibiotics induce mitochondrial*



- dysfunction and oxidative damage in Mammalian cells, *Sci Transl Med.*, 5(192), 2013 Jul 3, 192ra85.
32. Lamb R., Ozsvári B., Lisanti C. L., Tanowitz H. B., Howell A., Martinez-Outschoorn U.E., Sotgia F., Lisanti M.P., *Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease*, *Oncotarget*, 6(7), 2015, s. 4569-4584.
 33. Santini A., Ronchi D., Garbellini M., Piga D., Protti A., *Linezolid-induced lactic acidosis: the thin line between bacterial and mitochondrial ribosomes*, *Expert Opin Drug Saf.*, 16(7), 2017 Jul, s. 833-843.
 34. Khalaji M., Wróblewska A., Wielgus E., Bujacz G.D., Dudek M.K., Potrzebowski M.J., *Structural variety of heterosynthons in linezolid cocrystals with modified thermal properties*, *Acta Crystallographica Section B*, 76(5), 2020, s. 892-912.
 35. Song T., Lee M., Jeon H.S., Park Y., Dodd L.E., Dartois V., Follman D., Wang J., Cai Y., Goldfeder L.C., Olivier K.N., Xie Y., Via L.E., Cho S.N., Barry C.E., Chen R.Y., *Linezolid Trough Concentrations Correlate with Mitochondrial Toxicity-Related Adverse Events in the Treatment of Chronic Extensively Drug-Resistant Tuberculosis*, *EbioMedicine*, 2(11), 2015 Oct 9, s. 1627-33.
 36. Garrabou G., Soriano À., Pinós T., Casanova-Mollà J., Pacheu-Grau D., Morén C., García-Arumí E., Morales M., Ruiz-Pesini E., Catalán-García M., Milisenda J.C., Lozano E., Andreu A.L., Montoya J., Mensa J., Cardellach F., *Influence of Mitochondrial Genetics on the Mitochondrial Toxicity of Linezolid in Blood Cells and Skin Nerve Fibers*, *Antimicrob Agents Chemother*, 61(9), 2017 Aug 24, e00542-17.
 37. Ziarani G.M., Aleali F., Lashgari N., *Recent applications of barbituric acid in multicomponent reactions*, *RSC Adv.*, 6, 2016, s. 50895-50922.
 38. Shahzad S., Shahzadi L., Mahmood N., Siddiqi S.A., Rauf A., Manzoor F., Chaudhry A.A., Rehman I.U., Yar M., *A new synthetic methodology for the preparation of biocompatible and organo-soluble barbituric- and thiobarbituric acid based chitosan derivatives for biomedical applications*, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, 66, 2016 Sep 1, s. 156-163.
 39. Laxmi S.V., Rajitha G., Rajitha B., Rao A.J., *Photochemical synthesis and anticancer activity of barbituric acid, thiobarbituric acid, thiosemicarbazide, and isoniazid linked to 2-phenyl indole derivatives*, *Journal of chemical biology*, 9(2), 2015, s. 57-63.
 40. Marecki J.C., Aarattuthodiyil S., Byrd A.K., Penthala N.R., Crooks P.A., Raney K.D., *NNaphthoyl-substituted indole thio-barbituric acid analogs inhibit the helicase activity of the hepatitis C virus NS3*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 29(3), 2019, s. 430-434.
 41. Wang Y.H., Suk F.M., Liu C.L., Chen T.L., Twu Y.C., Hsu M.H., Liao Y.J., *Antifibrotic Effects of a Barbituric Acid Derivative on Liver Fibrosis by Blocking the NF- κ B Signaling Pathway in Hepatic Stellate Cells*, *Front Pharmacol.*, 11, 2020 Mar 31, s. 388.
 42. De Belin J.Y., Martin M.R., Finn P.W., Sayers L.G., Law N.M., Bilington D., Ryley S., Battacharya S., *Barbituric acid analogs as therapeutic agents*, WO 01/93841 A2, 2001.
 43. Qin X.-Y., Lee J., Zheng L., Yang J.-M., Gong Y., Park Y.-D., *Inhibition of α -glucosidase by 2-thiobarbituric acid: Molecular dynamics simulation integrating parabolic noncompetitive inhibition kinetics*, *Process Biochemistry*, 65, 2017, s. 62-70.
 44. Ali M., Barakat A., El-Faham A., Al-Rasheed H.H., Dahlous K., Al-Majid A.M., Sharma A., Yousuf S., Sanam M., Ul-Haq Z., Choudhary M.I., de la Torre B.G., Albericio F., *Synthesis and characterisation of thiobarbituric acid enamine derivatives, and evaluation of their α -glucosidase inhibitory and anti-glycation activity*, *J Enzyme Inhib Med Chem.*, 2020 Dec, 35(1), s. 692-701.
 45. Yin S.J., Si Y.X., Wang Z.J., Wang S.F., Oh S., Lee S., Sim S.M., Yang J.M., Qian G.Y., Lee J., Park Y.D., *The effect of thiobarbituric acid on tyrosinase: inhibition kinetics and computational simulation*, *J Biomol Struct Dyn.*, 2011 Dec, 29(3), s. 463-70.

46. Pastor N., Domínguez I., Orta M.L., Campanella C., Mateos S., Cortés F., *The DNA topoisomerase II catalytic inhibitor merbarone is genotoxic and induces endoreduplication*, *Mutat Res.*, 738-739, 2012 Oct-Nov, s. 45-51.
47. Li F., Zhang J., Arfuso F., Chinnathambi A., Zayed M.E., Alharbi S.A., Kumar A.P., Ahn K.S., Sethi G., *NF- κ B in cancer therapy*, *Arch Toxicol.*, 89(5), 2015 May, s. 711-31.
48. Olszewska A., Szewczyk A., *Mitochondria as a pharmacological target: magnum overview*, *IUBMB Life*, 2013 Mar, 65(3), s. 273-281.
49. Adepu S., Ramakrishna S., *Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions*, *Molecules*, 2021 Sep 29, 26(19), 5905.
50. Douroumis D., Ross S.A., Nokhodchi A., *Advanced methodologies for cocrystal synthesis*, *Adv Drug Deliv Rev.*, 117, 2017 Aug 1, s. 178-195.
51. Narayan R., Nayak U.Y., Raichur A.M., Garg S., *Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances*, *Pharmaceutics*, 10, 2018, s. 118.
52. Mitran R.A., Deaconu M., Matei C., Berger D., Thomas S., Mishra R.K., Dasgupta N., Ranjan S., [w:] Mohapatra S.S.(red.), *Nanocarriers for Drug Delivery*, Elsevier, 2019, s. 351-374.
53. Kresge C., Leonowicz M., Roth W., Vartuli J.C., Beck J.S., *Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquidcrystal template mechanism*, *Nature*, 359, 1992, s. 710-712.
54. Vallet-Regi M., Ramila A., Del Real R.P., Perez-Pariente J.A., *New Property of MCM-41: Drug Delivery System*, *Chem. Mater.*, 13(2), 2001, s. 308-311.
55. Tang F., Li L., Chen D., *Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery*, *Adv Mater.*, 24(12), 2012 Mar 22, s. 1504-34.
56. Skorupska E., Paluch P., Jeziorna A., Potrzebowski M.J., *NMR study of BA/FBA cocrystal confined within mesoporous silica nanoparticles employing thermal solid phase transformation*, *J. Phys. Chem. C*, 119, 2015, s. 8652-8661.
57. Skorupska E., Jeziorna A., Paluch P., Potrzebowski M.J., *Ibuprofen in mesopores of Mobil Crystalline Material 41 (MCM-41): a deeper understanding*, *Mol Pharm.*, 11(5), 2014 May 5, s. 1512-9.
58. Datt A., El-Maazawi I., Larsen S.C., *Aspirin Loading and Release from MCM-41 Functionalized with Aminopropyl Groups via Co-condensation or Postsynthesis Modification Methods*, *J. Phys. Chem. C*, 116, 34, 2012, s. 18358-18366.
59. Skorupska E., Jeziorna A., Potrzebowski M.J., *Thermal Solvent-Free Method of Loading of Pharmaceutical Cocrystals into the Pores of Silica Particles: A Case of Naproxen/Picolinamide Cocrystal*, *J. Phys. Chem. C*, 120, 24, 2016, s. 13169-13180.
60. Skorupska E., Jeziorna A., Potrzebowski M.J., *Thermal Solvent-Free Method of Loading of Pharmaceutical Cocrystals into the Pores of Silica Particles: A Case of Naproxen/Picolinamide Cocrystal*, *J. Phys. Chem. C*, 120, 24, 2016, s. 13169-13180.
61. Giri S., Trewyn B.G., Lin V.S., *Mesoporous silica nanomaterial-based biotechnological and biomedical delivery systems*, *Nanomedicine (Lond)*, 2, 2007, s. 99-111.
62. Slowing I., Trewyn B.G., Lin W.S.-Y., *Effect of Surface Functionalization of MCM-41-Type Mesoporous Silica Nanoparticles on the Endocytosis by Human Cancer Cells*, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 46, 2006, s. 14792-14793.
63. Ekkapongpisit M., Giovia A., Follo C., Caputo G., Isidoro C., *Biocompatibility, endocytosis, and intracellular trafficking of mesoporous silica and polystyrene nanoparticles in ovarian cancer cells: effects of size and surface charge groups*, *Int J Nanomedicine*, 7, 2012, s. 4147-58.
64. Abdo G.G., Zagho M.M., Khalil A., *Recent advances in stimuli-responsive drug release and targeting concepts using mesoporous silica nanoparticles*, *Emergent mater*, 3, 2020, s. 407-425.
65. Mi P., *Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, tumor imaging, therapy and theranostics*, *Theranostics*, 10(10), 2020, s. 4557-4588.

66. Mekaru H., Lu J., Tamanoi F., *Development of mesoporous silica-based nanoparticles with controlled release capability for cancer therapy*, *Adv Drug Deliv Rev.*, 2015 Dec 1, 95 s. 40-49.
67. McCarthy C.A., Ahern R.J., Dontireddy R., Ryan K.B., Crean A.M., *Mesoporous silica formulation strategies for drug dissolution enhancement: a review*, *Expert Opin Drug Deliv.*, 13(1), 2016, s. 93-108.
68. Li Z., Zhang Y., Feng N., *Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, classification, drug loading, pharmacokinetics, biocompatibility, and application in drug delivery*, *Expert Opin Drug Deliv.*, 2019, Mar, 16(3), s. 219-237.
69. Trzeciak K., Kaźmierski S., Wielgus E., Potrzebowski M.J., *DiSupLo – New extremely easy and efficient method for loading of active pharmaceutical ingredients into the pores of MCM-41 mesoporous silica particles*, *Microporous and Mesoporous Materials*, 308, 2020, 110506.
70. Maleki A., Kettiger H., Schoubben A., Rosenholm J.M., Ambrogio V., Hamidi M., *Mesoporous silica materials: From physico-chemical properties to enhanced dissolution of poorly water-soluble drugs*, *J Control Release*, 262, 2017 Sep 28, s. 329-347.
71. Lehto V., Riikonen J., Santos H., *Drug loading and characterisation of porous silicon materials. Porous silicon for biomedical applications*, Woodhead Publishing, 2014, Cambridge, UK, s. 337-355.
72. Keshavarz M., Mohammad Miri S., Behboudi E., Arjeini Y., Dianat-Moghadam H., Ghaemi A., *Oncolytic virus delivery modulated immune responses toward cancer therapy: Challenges and perspectives*, *Int Immunopharmacol.*, 108, 2022 Jul, 108882.
73. Kaufman H.L., Shalhout S.Z., Iodice G., *Talimogene Laherparepvec: Moving From First-In-Class to Best-In-Class*, *Front Mol Biosci.*, 9, 2022, 834841.
74. Cao G.D., He X.B., Sun Q., Chen S., Wan K., Xu X., Feng X., Li P.P., Chen B., Xiong M.M., *The Oncolytic Virus in Cancer Diagnosis and Treatment*, *Front Oncol.*, 10, 2020 Sep 9, 1786.
75. Kavanagh O.N., Croker D.M., Walker G.M., Zaworotko M.J., *Pharmaceutical cocrystals: from serendipity to design to application*, *Drug Discov Today*, 24(3), 2019 Mar, s. 796-804.
76. Bolla G., Nangia A., *Pharmaceutical cocrystals: walking the talk*, *Chem Commun (Camb)*, 2016 Jun 28, 52(54), s. 8342-60.
77. Gadade D.D., Pekamwar S.S., *Pharmaceutical Cocrystals: Regulatory and Strategic Aspects, Design and Development*, *Adv Pharm Bull.*, 6(4), 2016 Dec, s. 479-494.
78. Wróblewska A., Śniechowska J., Kaźmierski S., Wielgus E., Bujacz G.D., Mlostoń G., Chworos A., Suwara J., Potrzebowski M.J., *Application of 1-Hydroxy-4,5-Dimethyl-Imidazole 3-Oxide as Coformer in Formation of Pharmaceutical Cocrystals*, *Pharmaceutics*, 12(4), 2020 Apr 15, s. 359.
79. Karimi-Jafari M., Padrela L., Walker G.M., Croker D.M., *Creating Cocrystals: A Review of Pharmaceutical Cocrystal Preparation Routes and Applications*, *Cryst. Growth Des.*, 18, 10, 2018, s. 6370-6387.
80. Dudek M.K., Śniechowska J., Wróblewska A., Kaźmierski S., Potrzebowski M.J., *Cocrystals "Divorce and Marriage": When a Binary System Meets an Active Multifunctional Synthone in a Ball Mill*, *Chemistry*, 26(58), 2020 Oct 15, s. 13264-13273.
81. Akrami H., Aminzadeh S., Fallahi H., *Inhibitory effect of ibuprofen on tumor survival and angiogenesis in gastric cancer cell*, *Tumour Biol.*, 36(5), 2015 May, s. 3237-43.
82. Cejuela M., Martin-Castillo B., Menendez J.A., Pernas S., *Metformin and Breast Cancer: Where Are We Now?*, *Int J Mol Sci.*, 23(5), 2022 Feb 28, 2705.
83. Eskinazi-Budge A., Manickavasagam D., Czech T., Novak K., Kunzler J., Oyewumi M.O., *Preparation of emulsifying wax/glyceryl monooleate nanoparticles and evaluation as a delivery system for repurposing simvastatin in bone regeneration*, *Drug Dev Ind Pharm.*, 44(10), 2018 Oct, s. 1583-1590.

Powrót do przeszłości: nowe życie starych leków w terapiach antynowotworowych dzięki wykorzystaniu nowoczesnych systemów ich dostarczenia

Streszczenia

Problemem współczesnej farmakoterapii jest stosowanie zbyt dużych dawek terapeutycznych generowane przez przemiany farmakokinetyczne leków czy ich ograniczoną biodostępność jak również uboczne skutki ich działania, zwłaszcza w przypadku chemioterapeutyków. Rozwiązanie mogą stanowić nowe formy leków w postaci kokryształów oraz leków załadowanych do nośników, których głównym zadaniem jest dostarczenie leku do miejsca działania oraz jego uwolnienie. Z drugiej strony, zmiana strategii wykorzystania starych leków w nowej odsłonie to obiecujące rozwiązanie dla nowych terapii. Doniesienia literaturowe wskazują na potencjalną aktywność przeciwnowotworową leków pierwotnie stosowanych jako antybakteryjne, przeciwcukrzycowe czy psychotropowe. Ponadto, znaczną uwagę przywiązuje się do toksycznego wpływu środków farmakologicznych na dysfunkcję mitochondriów. Opracowanie systemów dostarczenia leków opartych na mezoporowatych materiałach ładowanych starymi lekami w nowej odsłonie znacznie zmniejsza ryzyko niepowodzenia. Wyzwania stawiane chemii, biologii, farmacji i medycynie jakimi są skuteczne rozwiązania dla walki z nowotworami mogą być rozwiązane dzięki głębszemu zrozumieniu i udoskonaleniu technik ładowania leków oraz funkcjonalizacji powierzchni mezoporowatych nośników. Z biomedycznego punktu widzenia postęp w funkcjonalizacji materiałów mezoporowatych pozwoli na maksymalne zminimalizowanie skutków ubocznych terapii przeciwnowotworowej oraz ogromny wzrost skuteczności terapii antynowotworowej. Należy mieć nadzieję, że zmiana przeznaczenia starych leków, które posiadają już zaawansowaną charakterystykę chemiczną jak i kliniczną odegra znaczącą rolę, a połączenie w jedno tych obiecujących obszarów badań zaowocuje w skuteczności terapeutycznej leków oraz ich selektywności wobec komórek nowotworowych.

Słowa kluczowe: systemy dostarczenia leków, mezoporowata krzemionka, zmiana przeznaczenia leku, polekowa dysfunkcja mitochondriów, terapia celowana

Back to the past: new life for old drugs in anticancer therapies thanks to modern delivery systems

Abstract

The problems of modern pharmacotherapy are the use of too high therapeutic doses which are generated by pharmacokinetic changes of drugs or their limited bioavailability as well as the side effects of their action, especially in the case of chemotherapeutics. The solution could be new forms of drugs in the form of co-crystals and the use of carriers whose main task is to deliver and release the drug to the site of action. On the other hand, changing the strategy of using old drugs in the new version is a promising solution for new therapies. Literature reports indicate the potential antitumor activity of drugs which were originally used as antibacterial, antidiabetic, and psychotropic. In addition, the toxic effect of pharmacological agents on mitochondrial dysfunction has received considerable attention. The development of drug delivery systems based on mesoporous materials loaded with old drugs in the new version significantly reduces the risk failure. The challenges facing chemistry, biology, pharmacy, and medicine in terms of effective anticancer solutions can be solved by deeper understanding and refinement of drug loading techniques and functionalization of mesoporous surfaces. From a biomedical perspective, the side effects of cancer therapy will be minimized as much as possible and its efficacy can be increased tremendously. It is hoped that the reuse of old drugs, which already have advanced chemical and clinical characteristics, will play an important role and the combination of these promising research areas will lead to therapeutic efficacy of drugs and their selectivity against cancer cells.

Keywords: drug delivery systems, mesoporus silica, drug repurposing, drug-induced mitochondrial dysfunction, targeted therapy

Wpływ leku pemetreksed i jego nośnika na strukturę membran białkowo-lipidowych

1. Wstęp

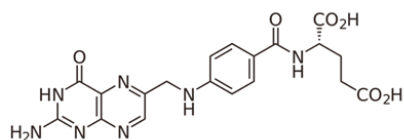
Największym problemem w obecnie stosowanych terapiach nowotworowych jest niszczenie zdrowych, niebędących celem leczenia komórek i tkanek organizmu. Ponadto osiągnięcie zakresu stężeń terapeutycznych, czyli takich, w którym dostarczony lek będzie działał terapeutycznie, ale nie będzie powodował efektów niepożądanych jest trudne, ponieważ trzeba go podawać w bardzo dużych dawkach. Rozwiązaniem tych ograniczeń może być zastosowanie terapii celowanej, która polega na dostarczaniu terapeutyku na przykład za pomocą nośnika do ściśle określonego miejsca w organizmie [1]. Terapia celowana nazywana również terapią personalizowaną, jest coraz powszechniej stosowaną terapią onkologiczną, z którą wiązane są olbrzymie nadzieje na poprawę skuteczności leczenia chorób nowotworowych [2]. Komórki nowotworowe mogą charakteryzować się zwiększoną obecnością na swojej powierzchni niektórych typów receptorów w stosunku do budowy komórek zdrowych. W komórkach nowotworowych może dochodzić do nadekspresji genów, które zawierają informację genetyczną o budowie receptorów kwasu foliowego. Oznacza to, że ekspresja genów, które kodują receptory kwasu foliowego, zachodzi zbyt często. Wynikiem tego jest większa liczba receptorów kwasu foliowego w błonie komórkowej komórki nowotworowej w porównaniu do liczby receptorów kwasu foliowego w błonie komórki prawidłowej [3, 4].

Receptor kwasu foliowego ma wysokie powinowactwo zarówno do kwasu foliowego, jak i związków chemicznych wykazujących podobieństwo do tej cząsteczki.

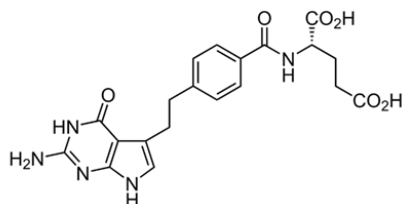
Kwas foliowy to związek chemiczny pochodzący z grupy witamin B, jest jednym z substratów niezbędnych w biosyntezie kwasów nukleinowych [5]. Jego formą biologiczną jest kwas tetrahydrofoliowy (THF), który powstaje przy udziale enzymu reduktazy dihydrofolianowej. THF pełni rolę przekaźnika grup hydroksymetylowych lub aldehydowych w biosyntezie zasad purynowych i pirymidynowych. Związki o strukturze zbliżonej do struktury kwasu foliowego mają wysokie powinowactwo do reduktazy dihydrofolianowej i pełnią rolę antagonistyczną, blokując wiązanie kwasu foliowego z enzymem. Wynikiem ich działania jest zaburzenie biosyntezy DNA/RNA, co w ostatecznym rezultacie powoduje śmierć komórki. Regularnie stosowanym związkiem z tej grupy antymetabolitów jest pemetreksed. Wykazuje on bowiem tysiąckrotnie wyższe powinowactwo do reduktazy dihydrofolianowej w porównaniu do naturalnego kwasu foliowego. Pemetreksed jest jednym z najbardziej uniwersalnych antymetabolitów. Ma zastosowanie w terapii antynowotworowej płuc oraz guzów litych jak również wykazał pewną skuteczność w leczeniu raka piersi czy jajnika. Lek ten jest silnie toksyczny wywołując niewydolność nerek czy wątroby.

¹ dniececka@chem.uw.edu.pl Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, www.chem.uw.edu.pl.





Kwas foliowy



Pemetreksed

Rysunek 1. Struktura kwasu foliowego oraz pemetreksedu [opracowanie własne]

Cząsteczka kwasu foliowego zawiera trzy pierścienie sześciocłonowe. Cząsteczka pemetreksedu natomiast ma w swojej budowie dwa pierścienie sześciocłonowe i jeden pierścień pięciocłonowy. Dodatkowo w cząsteczce kwasu foliowego pomiędzy pierwszym a drugim pierścieniem sześciocłonowym znajduje się grupa $-\text{CH}_2\text{NH}$, gdzie w cząsteczce terapeutyku znajduje się jedynie ugrupowanie $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$.

Molekuła analogu puryny swoją budową przypomina cząsteczkę zasady azotowej będącej pochodną puryny. Jeśli podczas replikacji DNA zostanie wstawiony nukleotyd z niewłaściwą zasadą azotową, tzn. niebędącą pochodną puryny (nie będzie to ani adenina, ani guanina), elongacja łańcucha polinukleotydu zostanie zakłócona. Synteza DNA nie zajdzie, ponieważ replikacja DNA nie zostanie pomyślnie zakończona. W związku z tym, że materiał genetyczny nie zostanie zreplikowany, komórka nie będzie mogła przystąpić do podziału. W ten sposób można zahamować nieustanne podziały komórek nowotworowych. Zasada działania analogu pirymidyny jest podobna do zasady działania analogu puryny [6].

W terapiach celowanych bardzo często wykorzystywane są także nośniki leków. Najpowszechniej stosowanymi nośnikami są superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza, których duży stosunek powierzchni do objętości powoduje dominację efektów powierzchniowych, a tym samym zwiększenie reaktywności tych cząstek [7, 8]. W związku z tym możliwa jest ich modyfikacja poprzez przyłączenie różnego typu związków do ich powierzchni. W konsekwencji tego gromadzą się one w komórkach posiadających białka receptorowe zdolne do ich rozpoznania. Działanie czynnikami zewnętrznymi takimi jak światło, pole magnetyczne lub wewnętrznymi takimi jak zmiana pH czy też obecność specyficznych enzymów powoduje uwolnienie leku w chorobowo zmienionym obszarze organizmu.

Rola superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza jako nośników leków nie ogranicza się jedynie do ich transportu do chorych komórek. Ich istotnym zastosowaniem jest również hipertermia magnetyczna, która stanowi przyszłościową perspektywę w leczeniu nowotworów [9, 10]. Podstawą termoterapii jest miejscowe podnoszenie temperatury ciała poprzez przyłożenie zmiennego pola magnetycznego o dużej często-



tlivości. Powoduje to niestabilność orientacji momentów magnetycznych występujących w nanocząstkach tlenku żelaza, a w konsekwencji ich drgania. Następuje zjawisko relaksacji Browna, w którym wzajemne tarcie nanocząstek powoduje lokalny wzrost temperatury ciała do temperatury wynoszącej około 41–45°C. Zastosowanie tego zjawiska w miejscu występowania komórek nowotworowych powoduje ich zniszczenie, ponieważ wykazują one wysoką wrażliwość na działanie temperaturami przekraczającymi temperatury płynów fizjologicznych, które wynoszą około 37°C. Poprzez zastosowanie podwyższonej temperatury komórki nowotworowe stają się bardziej wrażliwe na działanie leków, ale nie dochodzi do zniszczenia zdrowych komórek. Hipertermia magnetyczna w połączeniu z radioterapią i chemioterapią jest skuteczna w leczeniu nowotworów płuc, jajnika lub pęcherza moczowego.

Celem niniejszej pracy jest zbadanie wpływu leku pemetreksed i jego nośnika na strukturę warstw białkowo-lipidowych.

2. Materiał i metody

2.1. Synteza nanocząstek tlenku żelaza

Podczas prac eksperymentalnych wykonano syntezę magnetycznych nanocząstek tlenku żelaza wykorzystując metodę współstrącania. Odważono 0,75 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i 1,75 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a następnie sole żelaza wsypano do dwóch zlewek i rozpuszczono odpowiednio w 37,5 mL i 50 mL wody destylowanej. Oba roztwory mieszano magnetycznie przez 30 min. Podczas mieszania zmierzono pH w obu zlewkach, które wynosiło 2. Po upływie wyznaczonego czasu, zmieszano roztwory z obu zlewek (pH roztworu – 1,9). Zawiesinę nanocząstek otrzymano wkraplając wodny roztwór amoniaku, aż do momentu odpowiedniego pH = 10. Całość mieszano za pomocą mieszadła mechanicznego. Mieszanina reakcyjna stała się czarna, co wskazuje na tworzenie zawiesiny nanocząstek tlenku żelaza (SPIONs). Następnie zlewkę postawiono na magnesie neodymowym w celu przyspieszenia dekantacji osadu. Roztwór nad osadu odlano, a osad trzykrotnie przepłukano mieszaniną $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$. Czynność ta miała na celu usunąć nieprzereagowane substraty. Otrzymane nanocząstki tlenku żelaza stabilizowane cytrynianami ($\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{CA}$) zawieszono w 100 mL wody destylowanej.



Rysunek 2. Od lewej: wodny roztwór mieszaniny FeCl_2 i FeCl_3 ; zawiesina powstałych nanocząstek; zdekantowane nanocząstki na magnesie neodymowym [opracowanie własne]

Nanocząstki tlenku żelaza w środowisku wodną wykazują tendencję do aglomeracji. Do zapobiegania procesowi agregacji często wykorzystuje się środki powierzchniowo czynne takie jak np. kwas cytrynowy. Poprawia on stabilność zawiesiny poprzez uzyskanie silniejszych oddziaływań odpychających między nanocząstkami magnetycznymi.

Aby otrzymać nanocząstki magnetyczne stabilizowane cytrynianami otrzymane SPIONs zdekantowano za pomocą magnesu i usunięto supernatant z nad osadu, a następnie dodano 120 mL 0,05M kwasu cytrynowego. W kolejnym etapie ustalono pH na poziomie 5 poprzez wkraplanie wodnego roztworu amoniaku. Całość ogrzewano w 90°C oraz mieszano (250 RPM) przez 90 min w celu adsorpcji kwasu cytrynowego na powierzchni nanocząstek. Stabilizowane SPIONs strącono przy użyciu acetonu i oddzielono za pomocą magnesu. Fe₃O₄@CA czterokrotnie przepłukano wodą destylowaną. Proces ten miał na celu usunięcie nadmiarowego kwasu cytrynowego. Pomiędzy każdym płukaniem zawiesinę poddawano sonikacji przy użyciu homogenizatora ultradźwiękowego. Przemyte nanocząstki zawieszono w niewielkiej ilości wody i suszono w temp 50°C przez 12 h. W wyniku całego procesu syntezy uzyskano 200 mg Fe₃O₄@CA.

2.2. Modyfikacja nanocząstek lekiem

W pierwszym etapie przygotowano wodne roztwory EDC i NHS o stężeniu 1,5 mmol/dm³ i objętości odpowiednio 19 ml oraz 40 ml. Zawartość obu zlewek zmieszano ze sobą a następnie dodano 30 mg SPION@CA. Całość postawiono na mieszadle magnetycznym i mieszano ok. 10 h. Po tym czasie do zawiesiny wkroplono 2 ml roztworu pemetreksedu o stężeniu 5mg/ml. Następnie po 12 h zawiesinę przemity kilkakrotnie za pomocą acetonu.

2.3. Technika Langmuira

Do utworzenia monowarstw biometrycznych wykorzystano technikę Langmuira. Aparatura pomiarowa składa się z termostatowanej wanny Langmuira ze studnią oraz dwóch ruchomych barier. Przed rozpoczęciem pomiarów aparatura była dokładnie czyszczona chloroformem, 99% etanolem oraz wodą destylowaną, aby usunąć ewentualne pozostałości lipidu czy zanieczyszczenia. Do zarejestrowania izoterm Langmuira wykorzystano oprogramowanie KSV NIMA.

W celu utworzenia monowarstw na powierzchni subfazy nakroplono chloroformowe roztwory lipidów (20-40 µl) o końcowym stężeniu 2 mg/ml. Do badań zostały wykorzystane następujące związki: DOPC oraz oktadecyloamina. Pomiar prowadzone były w temperaturze 24°C. W tych warunkach żaden ze związków amfifilowych nie wykazywał przejścia fazowego.

Jako subfazę zastosowano wodę ultraczystą lub roztwór białka – receptora (alfa) kwasu foliowego o stężeniach: $3,125 \cdot 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$; $6,25 \cdot 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$; $6,25 \cdot 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Po upływie około 10 minut od nakroplenia związku na subfazę rozpuszczalnik całkowicie odparowywał, co umożliwiało rozpoczęcie pomiaru i rejestrację ciśnienia powierzchniowego (π) w funkcji powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę. Szybkość przesuwania barier wynosiła 10 mm/min, co umożliwiło otrzymanie membran o wysokim stopniu uporządkowania. Monowarstwy sprężane były do wartości ciśnienia 30 mN/m, takie ciśnienie gwarantuje ułożenie lipidów podobne jak w naturalnych błonach biologicznych. Wraz z przemieszczaniem się barier wzrastało ciśnienie

powierzchniowe oraz zmniejszały się odległości pomiędzy cząsteczkami lipidów. Wynikiem tego było utworzenie monowarstwy lipidowej na granicy faz woda/powietrze. Aby sprawdzić dokładność otrzymanych wyników każdy z pomiarów wykonano dwa razy a następnie gdy wartości te nie różniły się więcej niż 2-3%, obliczono średnią wartość powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę [\AA^2].

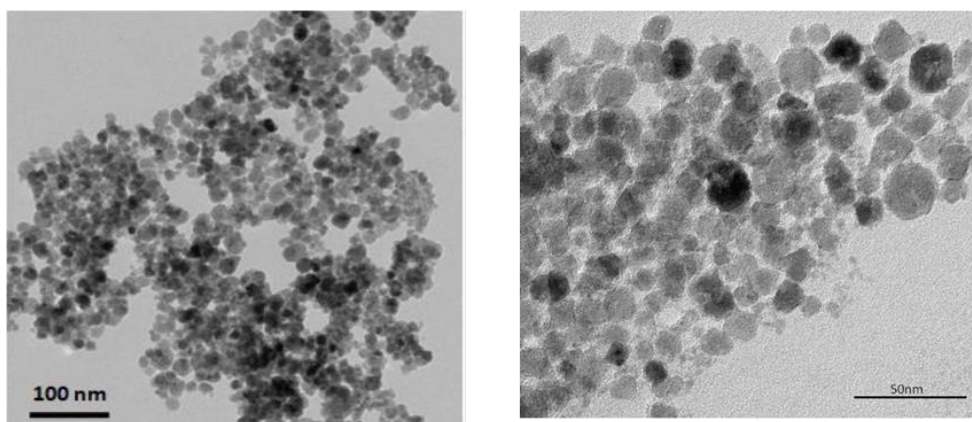
3. Analiza wyników

3.1. Charakterystyka otrzymanych struktur

Nanocząstki magnetyczne zsyntetyzowane metodą współstrącania, zostały scharakteryzowane przy wykorzystaniu takich technik pomiarowych jak: TEM, DLS, potencjał zeta czy TGA. Pozwoliły one na określenie parametrów fizykochemicznych otrzymanego produktu.

Nanocząstki tlenku żelaza zostały poddane badaniu za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego w celu zbadania ich kształtu i rozmiaru, ale również określenia ich poziomu dyspersji. W tym celu na miedziane siatki pokryte formvarem naniesiono wodną zawiesinę nanocząstek pokrytych kwasem cytrynowym i wysuszone. Na rysunku 3 (lewy panel) można zauważyć, że nanocząstki mają charakter monodispersyjny. Ich rozmiar oscyluje w granicach między 8 a 17 nm ze średnią wartością ok 13 nm.

Obraz TEM (rys. 3, prawy panel) zarejestrowany dla nanocząstek zmodyfikowanych lekiem pokazuje większy stopień agregacji nanostruktur. Na podstawie uzyskanego obrazu oszacowano rozmiar nanocząstek. Rozrzut wielkości mieści się w przedziale 8-26 nm.



Rysunek 3. Obrazy TEM dla nanocząstek tlenku żelaza modyfikowanych kwasem cytrynowym (lewy panel) oraz modyfikowanych lekiem (prawy panel) [opracowanie własne]

Rozmiar cząstek również określono wykorzystując technikę dynamicznego rozpraszania światła (DLS). W tym celu wprowadzono do kuwety kilka mikrolitrów wodnego roztworu nanocząstek tlenku żelaza i rozcieńczono wodą destylowaną do otrzymania lekko zabarwionej zawiesiny. Nanocząstki magnetyczne stabilizowane cytrynianami w roztworze wodnym charakteryzują się średnicą w przedziale od 25 do 44 nm. Największy procentowy udział mają nanocząstki o średnicy wynoszącej ok. 32 nm. W wyniku modyfikacji nanocząstek lekiem przeciwnowotworowym średnica nano-

struktur ulega znacznemu zwiększeniu. Średnia wielkość nanocząstek wynosi w tym przypadku $65,5 \pm 2,1$ nm.

Różnica między wynikami sporządzonymi na podstawie obrazów TEM, a analizą DLS wynika z warunków, w jakich są prowadzone oba eksperymenty. Podczas pomiarów transmisyjnej mikroskopii elektronowej nanocząstki są „suche”, przez co mierzona jest ich faktyczna średnica. Natomiast przy badaniach DLS cząstki magnetyczne zawieszane są w rozpuszczalniku wodnym, w wyniku czego otrzymujemy pomiar średnicy hydrodynamicznej (nanocząstka i otoczka solwatacyjna).

Jednym z bardzo ważnych parametrów charakteryzujących stabilizowane nanocząstki jest tak zwany potencjał zeta. Jest to liczbowe określenie stabilności zawiesiny w rozpuszczalniku. Parametr ten wyznaczany jest z pomiarów elektroforetycznych (ruchliwość cząstek w polu elektrycznym). Zakłada się, że dyspersja stabilna jest wtedy, gdy bezwzględna wartość potencjału Zeta jest większa od 30 mV.

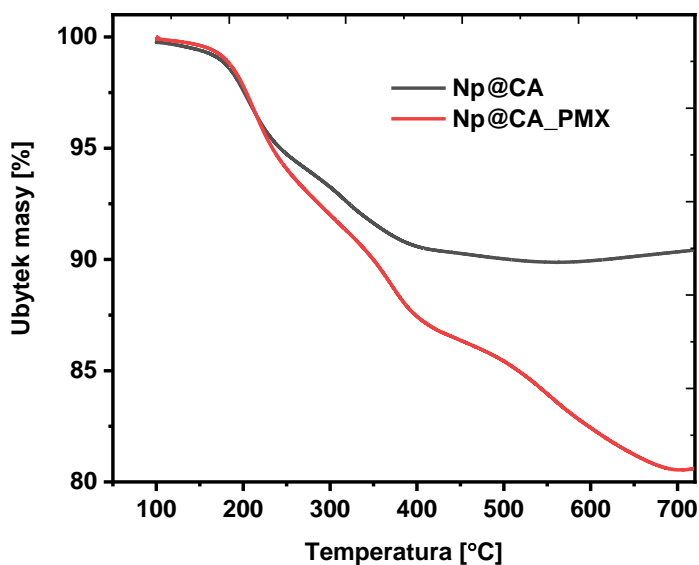
Podczas badań eksperymentalnych zbadano potencjał Zeta zawiesiny nanocząstek magnetycznych w wodzie. Do tego pomiaru wykorzystano spektrometr DLS, stosując kuetę kwarcową z umieszczonym zestawem elektrod.

Pomiary dla struktur stabilizowanych cytrynianami wykazały wysoki ujemny potencjał Zeta, który wynosi ok. -35 mV. Wysoka ujemna wartość wskazują na to, że jony cytrynianowe zostały dołączone do substratu, potwierdzając produkt przeprowadzonej syntezy. Dodatkowo niska wartość oznacza, że nanocząstki są stabilne, nie agregują w większe skupiska oraz nie ulegają sedymentacji w roztworze. Przyłączenie cząsteczek pemetreksadu do nośnika wpływa na obniżenie bezwzględnej wartości potencjału zeta do $-23,34 \pm 3,30$ mV. Świadczy to o modyfikacji części grup karboksylowych z kwasu cytrynowego i potwierdza pomyślnie przyłączenie terapeutyku za pomocą wiązania amidowego.

3.1.1. Analiza termogravimetryczna

Do określenia procentowej ilości leku na powierzchni nanocząstek wykorzystano TGA. Przedstawione krzywe termogravimetryczne zostały zarejestrowane w atmosferze gazu obojętnego (azot). Badaną próbkę ogrzewano z szybkością $10^\circ\text{C}/\text{min}$ w zakresie od 25 do 700°C . Z wykresu wynika, że kwas cytrynowy rozkłada się całkowicie w temperaturze 350°C , odparowując w postaci CO_2 oraz pozostając w bardzo niewielkiej ilości w próbce pod postacią węgla amorficznego. Interpretując krzywą można stwierdzić, że kwas cytrynowy stanowi 9% zawartości masowej próbki, a 91% stanowią nanocząstki magnetyczne i węgiel pochodzący z pozostałości cytrynianów (rys. 4). Na podstawie obu termogramów można określić także masę leku związaną z nośnikiem (czerwona krzywa). Okazuje się, że ilość pemetreksadu stanowi ok 9,5% czyli w 1 g koniugatu znajduje się ok. 95 mg leku przeciwnowotworowego.





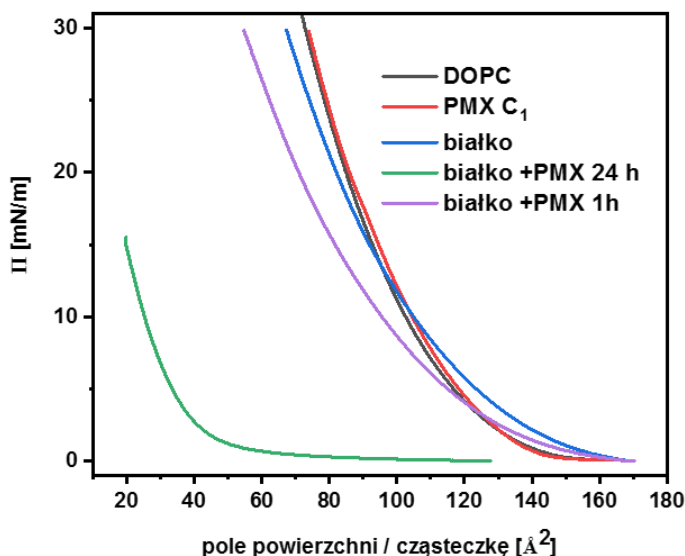
Rysunek 4. Termogram zarejestrowany dla nanocząstek modyfikowanych kwasem cytrynowym (czarna krzywa) oraz lekiem (czerwona krzywa) [opracowanie własne]

3.2. Oddziaływanie leku oraz koniugatu z membranami białkowo-lipidowymi

Druga część pracy związana była z badaniami nad oddziaływaniem leków oraz koniugatów z membranami biomimetycznymi zbudowanymi ze struktur białkowo-lipidowych. Do tego celu wykorzystana została technika Langmuira [11, 12].

Jednym ze stosowanych związków był lipid DOPC. Zarejestrowane izotermie zostały przedstawione na rysunku 5. Dodatek leku o stężeniu 1×10^{-5} M do subfazy nie powoduje zmian w strukturze błony, co widać w przebiegu izotermie, gdyż obie krzywe (dla samego lipidu oraz z lekiem) na wykresie 5 są niemal identyczne. Dopiero zastosowanie wyższego stężenia terapeutycznego (2×10^{-5} M) przyczynia się do pewnej kumulacji (ok 10 %) związku w warstwie lipidowej (dane nie pokazane). Po dodaniu do subfazy 10 μ l (C_1) lub 20 μ l (C_2) białka kąt nachylenia izotermie π -A rośnie, zaś dla ciśnienia powierzchniowego ok 30 mN/m powierzchnia przypadająca na pojedynczą cząsteczkę DOPC maleje o około 7% (10 μ l białka) lub 20% (20 μ l białka – dane nie pokazane na wykresie). Gdy subfazę stanowiła woda z dodatkiem białka C_2 , na izotermie π -A pojawia się przegięcie związane prawdopodobnie z oddziaływaniami lipid-receptor.

Wraz ze zwiększaniem stężenia białka spada wartość pola powierzchni przypadającego na jedną cząsteczkę lipidu. W przypadku dodatku do subfazy obu związków: białka i leku zauważamy zmianę kąta nachylenia izotermie, jednak ma to znaczący wpływ na spadek pola powierzchni, który wykazuje silną zależność czasową.



Rysunek 5. Izotermę Langmuira dla lipidu DOPC; oznaczenia na wykresie [opracowanie własne]

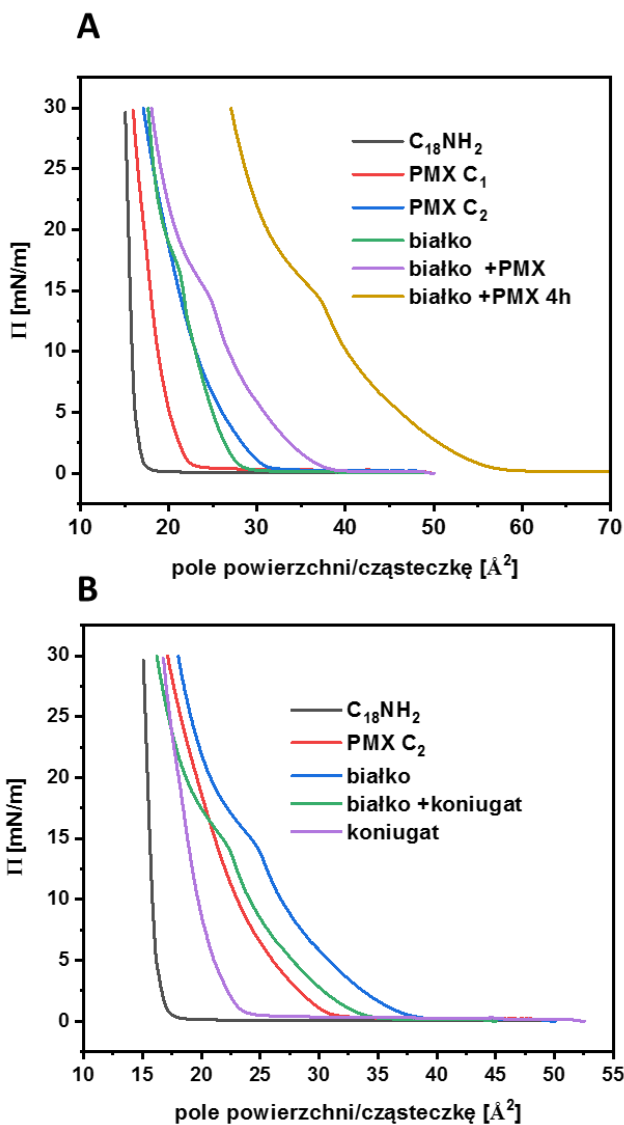
Okazuje się, że im dłuższy czas oczekiwania na pomiar, tym izoterma wykazuje znaczne przesunięcie w lewą stronę. Po ok 24 h od zainicjowania eksperymentu wartość pola powierzchni spada do ok 20 \AA^2 /cząsteczkę przy ciśnieniu zaledwie 15 mN/m, gdyż dalsze sprężanie warstwy jest niemożliwe. W przypadku dodatku do subfazy nanocząstek modyfikowanych lekiem nie są zauważalne różnice w przebiegu krzywych π -A. Okazuje się, że silne oddziaływania między lipidem i receptorem powodują przechodzenie lipidu do subfazy, co uwidacznia się spadkiem pola powierzchni pomimo dodatku do subfazy koniugatu [13].

Drugim stosowanym związkiem filmotworczym była oktadecyloamina $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{NH}_2$. Po dodaniu do subfazy leku o stężeniu C_1 oraz C_2 kąt nachylenia izotermę π -A dla aminy ulega zmianie, natomiast pole powierzchni przypadające na pojedynczą cząsteczkę warstwy rośnie w granicach 6-15% w zależności od stężenia pemetreksadu. Obecność białka w subfazie także powoduje zwiększanie pola powierzchni, co świadczy o tworzeniu się oddziaływania lipid-receptor. Potwierdzeniem tych interakcji jest widoczne na izotermie przegięcie przy ciśnieniu ok 15 mN/m. Ponadto wraz ze wzrostem ilości białka w subfazie rośnie wartość A_{pm} . W przypadku obecności w subfazie leku oraz receptora dodatek już najmniejszego stężenia obu związków przyczynia się do przesunięcia izotermę w prawą stronę oraz zmiany kąta nachylenia krzywej ze wspomnianym charakterystycznym przegięciem. W porównaniu do lipidu DOPC dla aminy nie zauważamy zmniejszenia pola powierzchni wywołanego dodatkiem białka nawet po długim czasie oczekiwania na pomiar ok 24 h (dane nie pokazane na wykresie), co potwierdza brak przechodzenia związku filmotworczego do subfazy.

Ostatnim etapem badań był dodatek do subfazy koniugatu (Np@CA_PMX). Zawartość leku w koniugacie odpowiadała ilości leku C_2 w poprzednio opisanych eksperymentach. Okazuje się, że obecność nanocząstek zmodyfikowanych PMX wpływa na zwiększenie pola powierzchni a więc lek oddziałuje z membraną jednak

w postaci związanej z nanostrukturą kumuluje się go mniej w błonie oraz dodatkowo następuje zmiana organizacji lipidu, co potwierdza zmiana kąta nachylenia izoterm (rys. 6). Mniejszy stopień powinowactwa pemetreksedu do warstwy może być związany z zablokowaniem grup funkcyjnych w strukturze terapeutyku zaangażowanych w tworzenie wiązania Np@CA-lek.

W przypadku, gdy do subfazy z koniugatem dołączone jest białko na krzywej π -A widoczne jest przegięcie charakterystyczne dla oddziaływania receptor – oktadecylamina. Przy niskich wartościach ciśnienia powierzchniowego zauważalny jest duży wzrost A_{pm} , jednak wraz ze wzrostem ciśnienia ulega zmniejszeniu do wartości odpowiadającej ilości leku w koniugacie.



Rysunek 6. Izoterm Langmuira dla oktadecylaminy; oznaczenia na wykresie [opracowanie własne]

4. Wnioski/Podsumowanie

Zmiana w przebiegu izotermy π -A przejawia się zmianą kąta nachylenia krzywej lub zmianą powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę amfifilowego związku dla ciśnienia powierzchniowego $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$. Odmienne nachylenie izotermy związane jest ze zmianą kąta ułożenia hydrofobowych ogonów w cząsteczce lipidu na granicy faz woda/powietrze natomiast różnica w wartościach pola powierzchni oznacza zmianę odległości pomiędzy hydrofilowymi głowami cząsteczek amfifilowego związku chemicznego. Obserwowane zmiany w przebiegu izotermy π -A zależą od rodzaju badanego związku chemicznego.

Po dodaniu do wody białka, kąt nachylenia izotermy π -A rośnie zaś powierzchnia przypadająca na jedną cząsteczkę maleje (DOPC) lub zwiększa się ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{NH}_2$) w zależności od wykorzystanego lipidu czy jego analogu. W przypadku lipidu DOPC, im większa jest objętość białka dodanego do wody, tym mniejsza jest powierzchnia przypadająca na jedną cząsteczkę DOPC. Ponadto gdy subfazę stanowiła woda z dodatkiem $10 \mu\text{l}$ białka, przebieg izotermy π -A zależy od czasu oczekiwania na pomiar. Po 24 h izoterma π -A charakteryzuje się długim plateau, dla którego ciśnienie powierzchniowe $\pi \cong 0 \text{ mN/m}$, oraz niewielką wartością powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę DOPC przy $\pi = 15 \text{ mN/m}$. Dla związku $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{NH}_2$, im większa jest objętość białka dodanego do wody, tym większa powierzchnia przypadająca na jedną cząsteczkę. Ponadto dłuższy czas oczekiwania na pomiar oznacza większy kąt nachylenia izotermy π -A.

Obserwowane zmiany w przebiegu izotermy π -A mogą wynikać z wbudowania się cząsteczek receptora 1 (alfa) kwasu foliowego w monowarstwę Langmuira lub istnienia oddziaływań pomiędzy cząsteczkami receptora a cząsteczkami amfifilowego związku budującego monowarstwę Langmuira, co zostało przedstawione na rysunku 7.

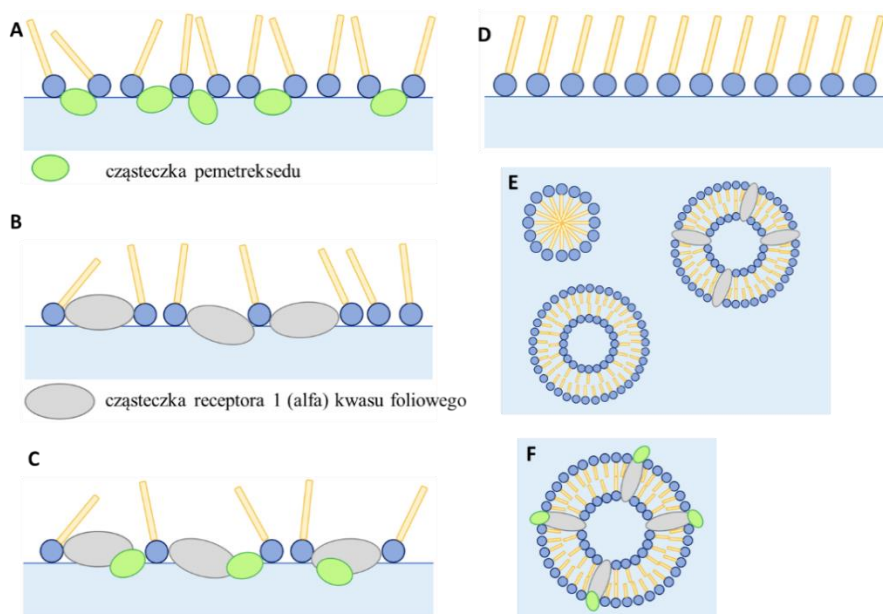
Długie plateau (dla $\pi \cong 0 \text{ mN/m}$), niewielka wartość powierzchni przypadającej na jedną cząsteczkę DOPC przy $\pi = 15 \text{ mN/m}$, po 24 h od dodatku białka, mogą wynikać z przedostawania się cząsteczek DOPC z monowarstwy Langmuira (granicy faz) do subfazy, gdzie jest możliwe tworzenie się miceli (a) i liposomów (b) zbudowanych z cząsteczek DOPC lub proteoliposomów (c) zbudowanych z cząsteczek DOPC i cząsteczek receptora kwasu foliowego (rys. 7) Tworzenie się miceli i liposomów zbudowanych jedynie z cząsteczek DOPC jest mniej prawdopodobne, ponieważ struktury te powinny tworzyć się także w przypadku braku receptora w subfazie. Bardziej prawdopodobne jest tworzenie się proteoliposomów zbudowanych z cząsteczek DOPC i cząsteczek receptora 1 (alfa) kwasu foliowego.

Obecność związków jak DOPC posiadających w swojej strukturze dużą hydrofilową głowę sprzyja tworzeniu się proteoliposomy w subfazie. W przypadku oktadecyloaminy, której cząsteczka ma małą polarną część, nie dochodzi do tworzenia się nanostruktur typu liposomy czy micelle co potwierdza wzrost pola powierzchni cząsteczkę.

Po dodaniu do wody z białkiem roztworu leku przeciwnowotworowego rośnie kąt nachylenia izotermy bez względu na rodzaj stosowanego związku amfifilowego. Pole powierzchni/ cząsteczkę dla lipidu nie zależy od stężenia leku a od czasu oczekiwania na pomiar, co związane może być z tworzeniem się nanostruktur białkowo-lipidowych.

W przypadku DOPC, im większa jest objętość białka w wodzie, tym mniejsza jest powierzchnia przypadająca na jedną cząsteczkę DOPC, natomiast dla aminy następuje zwiększenie wartości A_{pm} Obserwowane zmiany w przebiegu izotermy π -A mogą

wynikać z wiązania cząsteczek pemetreksedu, które są podobne do cząsteczek kwasu foliowego, przez cząsteczki receptora kwasu foliowego, co zostało przedstawione na rysunku 1.



Rysunek 7. Sposób ułożenia lipidów w zależności od składu subfazy. Dokładny opis w tekście [opracowanie własne]

Podziękowania

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego Sonata (UMO-2016/23/D/ST4/0321) finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Literatura

1. Crisci S., Amitrano F., *Overview of Current Targeted Anti-Cancer Drugs for Therapy in Onco-Hematology*, *Medicina*, 55, 2019, s. 1-28.
2. Lee Y.T., Tan Y.J., *Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity*, *European Journal of Pharmacology*, 834, 2018, s. 188-196.
3. Fernandez M., Javaid F., Chudasama V., *Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers*, *Chemical Science*, 8, 2018, s. 790-810.
4. Frigerio B., *Folate receptors and transporters: biological role and diagnostic/therapeutic targets in cancer and other diseases*, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38, 2019, s. 1-12.
5. Bellotti E., Cascone M.G., Barbani N., Rossin D., Rastaldo R., Giachino C., *Targeting Cancer Cells Overexpressing Folate Receptors with New Terpolymer-Based Nanocapsules: Toward a Novel Targeted DNA Delivery System for Cancer Therapy*, *Biomedicines*, 9, 2021, s. 1-17.
6. Chia-Sing L., Ching-Wen L., Ya-Hsuan C., Hsuan-Yu C., Wei-Chia C., Wei-Yun L., *Antimetabolite pemetrexed primes a favorable tumor microenvironment for immune checkpoint blockade therapy*, *The Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8, 2020, s. 1-16.
7. Nieciecka D., Królikowska A., Kijewska K., Blanchard G.J., Krysinski P., *Hydrophilic iron oxide nanoparticles probe the organization of biomimetic layers: Electrochemical and spectroscopic evidence*, *Electrochimica Acta*, 209, 2016, s. 671-681.



8. Nieciecka D., Kijewska K., Baumler S.M., Puszko A.K., Misicka A., Krysiński P., *Interactions of mitoxantrone-modified superparamagnetic Iron oxide nanoparticles with biomimetic membranes and cells*, Journal of Materials Science and Engineering B, 10, 2020, s. 34-48.
9. Nieciecka D., Celej J., Żuk M., Majkowska-Pilip A., Żelechowska-Matysiak K., Lis A., Osial M., *Hybrid System for Local Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia Based on SPIONs Loaded with Doxorubicin and Epirubicin*, Pharmaceutics, 13, 2021, s. 1-22.
10. Nieciecka D., Rękorajska A., Cichy D., Końska P., Żuk M., Krysiński P., *Synthesis and Characterization of Magnetic Drug Carriers Modified with Tb³⁺ Ions*, Nanomaterials, 12, 2022, s. 1-20.
11. Bourgaux C., Couvreur P., *Interactions of anticancer drugs with biomembranes: What can we learn from model membranes?*, Journal of Controlled Release, 190, 2014, s. 127-138.
12. Elderdfi M., Sikorski A.F., *Langmuir-monolayer methodologies for characterizing protein-lipid interactions*, Chemistry and Physics of Lipids, 212, 2018, s. 61-72.
13. Matyszewska D., *The influence of charge and lipophilicity of daunorubicin and idarubicin on their penetration of model biological membranes—Langmuir monolayer and electrochemical studies*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, 1862, 2020, s. 1-10.

Wpływ leku pemetreksed i jego nośnika na strukturę membran białkowo-lipidowych

Streszczenie

W poniższej pracy zbadano oddziaływanie leku pemetreksed oraz jego nośnika z dwoma rodzajami membran biomimetycznych. Filmy tworzone były metodą Langmuira z wykorzystaniem dwóch rodzajów związków amfifilowych lipidu DOPC oraz oktadecylaminy. Pemetreksed wykazuje podobieństwo do kwasu foliowego dzięki czemu może być wykorzystywany w terapii celowanej. Jak nośnik leku zastosowano nanocząstki tlenku żelaza i pomyślnie zsyntetyzowano koniugat. Sposób oddziaływania związków z membranami lipidowo-białkowymi analizowano za pomocą izoterm Langmuira. Częsteczki pemetreksedu mogą wbudować się w monowarstwę lub mogą tworzyć oddziaływania z cząsteczkami amfifilowego związku chemicznego budującego monowarstwę Langmuira. Powoduje to zmianę sposobu ułożenia cząsteczek w membranie lub tworzenie nanostruktury lipidowo-białkowej jak micelle czy liposomy.

Słowa kluczowe: technika Langmuira, pemetreksed, membrany biomimetyczne, nośniki leków

Influence of pemetrexed drug and its carrier on the structure of biomimetic membranes

Abstract

In this work the interaction of the drug pemetrexed and its carrier with two types of biomimetic membranes was investigated. The films were formed by Langmuir method with the use of two types of amphiphilic compounds of the DOPC lipid and octadecylamine. Pemetrexed is similar to folic acid and therefore can be used in targeted therapy. As a drug carrier, iron oxide nanoparticles were used and the conjugate was successfully synthesized. The way of interaction between lipid-protein membranes and drug or carrier using Langmuir isotherms was analyzed. The pemetrexed molecules can be incorporated into the monolayer or can interact with the molecules of the amphiphilic monolayer. This causes a change in the arrangement of molecules in the membrane or the formation of a lipid-protein nanostructure such as micelles or liposomes.

Keywords: Langmuir's technique, pemetrexed, biomimetic membranes, drug carriers

Przeciwciała monoklonalne w leczeniu dyslipidemii – aktualne możliwości

1. Wstęp

Dyslipidemia jest zaburzeniem metabolizmu, które stanowi jedną z najczęściej rozpoznawanych i leczonych chorób przewlekłych. Pojęcie to odnosi się do nieprawidłowości w zakresie najważniejszych parametrów gospodarki lipidowej, takich jak stężenie cholesterolu całkowitego (TC, ang. *total cholesterol*), stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein o niskiej gęstości (LDL-C, ang. *low-density lipoprotein cholesterol*), stężenie cholesterolu frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL-C, ang. *high-density lipoprotein cholesterol*), oraz stężenie trójglicerydów (TG, ang. *triglycerides*) we krwi i/lub obecności dysfunkcyjnych lipoprotein [1]. Dyslipidemia jest ważnym modyfikowalnym czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy tętnic oraz jednostek chorobowych rozwijających się na jej podłożu [2, 3]. Do najważniejszych chorób układu sercowo-naczyniowego w przebiegu miażdżycy należy choroba niedokrwienna serca, udar mózgu oraz choroba tętnic obwodowych [4].

Oszacowano (badanie NATPOL 2011), że w polskim społeczeństwie dyslipidemia występuje u ponad 60% osób dorosłych [5]. Zgodnie z wynikami badania WOBASZ II w latach 2013-2014 hipercholesterolemia występowała u 70,3% mężczyzn oraz 64,3% kobiet w Polsce [6]. Warto zwrócić uwagę, że u części z tych chorych zaburzenia gospodarki lipidowej pozostają nierozpoznane, a tym samym nie otrzymują oni odpowiedniego leczenia [7].

Priorytetem w leczeniu dyslipidemii jest obniżenie stężenia LDL-C do wartości docelowych, ustalonych indywidualnie w oparciu o ocenę ryzyka sercowo-naczyniowego u konkretnego chorego. Lekami pierwszego wyboru są inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A, czyli statyny (lowastatyna, simwastatyna, prawastatyna, fluwastatyna, atorwastatyna, rosuwastatyna i pitawastatyna) [1]. Najczęściej stosowane są atorwastatyna i rosuwastatyna, a już w 2021 roku na polskim rynku pojawiła się pitawastatyna [8], która stosowana w dawce 4 mg przez 6 tygodni może zredukować stężenie LDL-C o średnio 42,8% [9]. Istotną rolę w farmakoterapii dyslipidemii odgrywa również lek hamujący wchłanianie cholesterolu, ezetymib, który stosowany w dawce 10 mg powoduje zmniejszenie stężenia LDL-C o około 15-25%. Dołączenie tego leku do statyny powoduje obniżenie stężenia LDL-C o dalsze 15-20% [8].

¹ gabrielaszpila99@gmail.com, Studenckie Koło Naukowe, Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Angiologii i Medycyny Fizykalnej w Bytomiu, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.angiomedfiz.sum.edu.pl

² pilat.patrycja91011@wp.pl, Studenckie Koło Naukowe, Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Angiologii i Medycyny Fizykalnej w Bytomiu, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.angiomedfiz.sum.edu.pl

³ grzegorz.k.jakubiak@gmail.com, Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Angiologii i Medycyny Fizykalnej w Bytomiu, Wydział Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, www.angiomedfiz.sum.edu.pl



Zastosowanie w leczeniu dyslipidemii mają także agonisci receptorów PPAR α (fibraty), kwasy omega-3, żywice jonowymiennne i kwas nikotynowy [1, 8].

Mimo, iż istnieje szereg substancji czynnych, o różnych mechanizmach działania, które są stosowane w leczeniu dyslipidemii, to u części chorych nie udaje się uzyskać docelowego stężenia LDL-C, co wskazuje na konieczność poszukiwania nowych leków. Szczególnie intensywnego leczenia hipolipemizującego wymagają chorzy z hipercholesterolemią rodzinną, zwłaszcza w przypadku postaci homozygotycznej [10, 11]. Do najnowszych możliwości leczenia dyslipidemii należą inhibitory proproteinowej konwertazy subtylizyna-keksyna typu 9 (PCSK9, ang. *proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*), do których należą alirokumab i ewolokumab, a także ewinakumab, inhibitor białka 3 podobnego do angiopoetyny (ANGPTL3, ang. *angiopoetin-like protein 3*). Wspomniane leki są już dopuszczone do użytku w rutynowej praktyce klinicznej na terytorium Unii Europejskiej, lecz nie są jeszcze szeroko dostępne, głównie z uwagi na wysoki koszt. Aktywność białka PCSK9 może zostać zmniejszona również za pomocą małego interferującego kwasu rybonukleinowego (siRNA, ang. *small interfering ribonucleic acid*), który łącząc się z cząsteczką mRNA hamuje syntezę białka PCSK9. Jediną dostępną w praktyce klinicznej substancją o takim mechanizmie działania jest inkiliran [12].

Celem niniejszej pracy jest przeprowadzenie przeglądu literatury i przedstawienie najważniejszych informacji z zakresu aktualnego stanu wiedzy na temat właściwości farmakologicznych przeciwciał monoklonalnych, takich, jak inhibitory PCSK9 oraz przeciwciała hamujące aktywność białka ANGPTL3, a także ich skuteczności i bezpieczeństwa oraz roli, jaką odgrywają w leczeniu zaburzeń gospodarki lipidowej.

2. Białko PCSK9 – budowa i funkcje

Białko PCSK9 to proteaza serynowa, która ulega ekspresji w hepatocytach [13] oraz w komórkach jelita cienkiego, a także w mniejszych ilościach w płucach, nerkach, grasicy i śledzionie [14]. Genetycznie uwarunkowane zwiększenie aktywności białka PCSK9, tj. mutacje typu *gain-of-function*, mogą prowadzić do zwiększenia stężenia LDL-C w surowicy, zwiększając ryzyko rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego, zaś genetycznie uwarunkowane zmniejszenie aktywności białka PCSK9, tj. mutacje typu *loss-of-function* mogą prowadzić do odwrotnego skutku, co wiąże się z działaniem ochronnym na układ sercowo-naczyniowy [15]. Gen *PCSK9* jest zlokalizowany na ramieniu krótkim pierwszego chromosomu (1p32.3), a łańcuch polipeptydowy będący pierwotnym produktem ekspresji genu jest złożony z 692 aminokwasów i składa się z peptydu sygnalizacyjnego, prodomeny, domeny katalitycznej, regionu zawiasowego i C-końcowej domeny bogatej w cysteinę i histydynę. Dojrzała forma białka PCSK9 powstaje następnie w wyniku dalszej modyfikacji postranslacyjnej w obrębie siateczki śródplazmatycznej [16].

Cząsteczki lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) ulegają endocytozie do wnętrza hepatocytów po utworzeniu kompleksu z obecnymi w błonie komórkowej receptorami LDL (LDLR). Wewnątrz hepatocytu kompleks LDL-LDLR ulega dysocjacji, a LDLR powraca do błony komórkowej (recyrkulacja receptorów LDLR). Jednakże jeśli do kompleksu LDL-LDLR zostanie dodatkowo przyłączona cząsteczka PCSK9, to receptor LDLR nie powraca do błony komórkowej lecz jest kierowany na szlak degradacji lizosomalnej. Aktywność PCSK9 przyczynia się zatem do mniej ekonomicznego wykorzystania LDLR, co wiąże się z obniżeniem efektywności klirensu LDL i zwiększenia stężenia tych lipoprotein we krwi [17, 18].



3. Inhibitory PCSK9

Wśród inhibitorów PCSK9 wyróżnić można bokocizumab, ewolokumab i alirokumab [8, 13, 14]. W przeprowadzonych badaniach klinicznych wykazano, że inhibitory PCSK9 stosowane w monoterapii lub w terapii skojarzonej, znacząco obniżają stężenie LDL-C oraz zmniejszają ryzyko wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych. Alirokumab i ewolokumab w leczeniu skojarzonym ze statynami w maksymalnych tolerowanych dawkach powodują zmniejszenie stężenia LDL-C o 46-73% w porównaniu z placebo oraz o 30% w stosunku do ezetymibu [19].

3.1. Bokocizumab

Bokocizumab to humanizowane przeciwciało monoklonalne [13], zawierające kilka procent białek mysich, które mogą prowadzić do immunogenności [20]. W 2016 roku został on wycofany z dalszych badań klinicznych ze względu na pojawienie się w osoczu pacjentów wysokiego miana przeciwciał przeciwleukowych, które powodowały reakcje alergiczne w miejscu podania oraz osłabienie hipolipemizującego działania leku [13, 20, 21]. W badaniu SPIRE HR (*Studies of PCSK9 Inhibition and the Reduction of Vascular Events*) u 44% badanych wykryto przeciwciała przeciwleukowe, a u 27% stwierdzono obecność przeciwciał neutralizujących [22].

Randomizowane badania kliniczne z podwójnie ślepą próbą SPIRE-1 i SPIRE-2, rozpoczęte w 2013 roku, miały na celu ocenę skuteczności i bezpieczeństwa stosowania bokocizumabu wśród pacjentów z rozpoznaną chorobą układu sercowo-naczyniowego lub z wysokim ryzykiem wystąpienia pierwszego zdarzenia sercowo-naczyniowego. Warunkiem koniecznym dla włączenia do badania SPIRE-1 było leczenie statyną przez co najmniej 4 tygodnie oraz LDL-C równe co najmniej 70 mg/dl przed włączeniem do badania, a stężenie nie-HDL-C równe co najmniej 100 mg/dl. W badaniu SPIRE-2 uczestniczyły również osoby, które nie stosowały statyn z powodu złej tolerancji tych leków, zaś stężenie LDL-C i nie-HDL-C było równe co najmniej odpowiednio 100 mg/dl i 130 mg/dl. Do udziału w badaniu SPIRE-1 zgłosiło się 16 817 pacjentów, zaś w przypadku badania SPIRE-2 zgłosiło się 10 621 osób. Po sześciotygodniowym okresie przyjmowania placebo, pacjenci zostali zakwalifikowani do grupy badawczej (150 mg bococizumabu podskórnie co 2 tygodnie; dawkę zmniejszono w razie spadku stężenia LDL-C poniżej 10 mg/dl) lub do grupy kontrolnej (placebo). W momencie zakończenia badania mediana czasu obserwacji wynosiła 7 miesięcy w badaniu SPIRE-1 i 12 miesięcy w badaniu SPIRE-2. Po 14 tygodniach średnia zmiana stężenia LDL-C wynosiła -56,0% wśród pacjentów w grupie otrzymującej bococizumab i +2,9% wśród pacjentów w grupie placebo. Badania SPIRE-1 i SPIRE-2 zostały zakończone przedwcześnie, ponieważ stwierdzono powstawanie przeciwciał przeciwleukowych. Zdarzenia niepożądane, skutkujące odstawieniem leku, występowały częściej w grupie badawczej niż w grupie kontrolnej. W badaniu SPIRE-1 nie zaobserwowano korzyści ze stosowania bococizumabu w odniesieniu do pierwszorzędnego punktu końcowego, jakim były poważne zdarzenia sercowo-naczyniowe (tj. zawał mięśnia sercowego niezakończony zgonem, udar mózgu niezakończony zgonem, hospitalizacja z powodu niestabilnej dławicy piersiowej wymagającej pilnej rewaskularyzacji lub zgon z przyczyn sercowo-naczyniowych). Natomiast w badaniu SPIRE-2, w którym okres obserwacji był dłuższy, tak samo zdefiniowany pierwszorzędnym punktem końcowym wystąpił u istotnie mniejszego odsetka pacjentów przyjmujących bokocizumab w porównaniu z grupą kontrolną [23].

3.2. Ewolokumab i alirokumab

W 2015 r. Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków oraz Europejska Agencja Leków zatwierdziła dwa przeciwciała monoklonalne tj. ewolokumab [24] i alirokumab do stosowania u chorych z hipercholesterolemią rodzinną lub u pacjentów po przebytych incydentach sercowo-naczyniowych, którzy wymagają znacznego obniżenia stężenia LDL-C [20]. Ewolokumab jest stosowany podskórnym w dawce 140 mg co dwa tygodnie lub w 420 mg co miesiąc. Alirokumab jest podawany drogą podskórną w dawce 75 mg lub 150 mg co dwa tygodnie lub 300 mg raz w miesiącu [17].

Najbardziej przełomowe wyniki dotyczącym ewolokumabu otrzymano w badaniu FOURIER (*Further Cardiovascular Outcomes Research with PCSK9 Inhibition in Subjects with Elevated Risk*). W badaniu tym wzięło udział 27 564 pacjentów po przebytych incydentach sercowo-naczyniowych, którzy przyjmowali stałą, maksymalną dawkę statyny oraz ich wyjściowe stężenie LDL-C wynosiło 70 mg/dl lub więcej. Średni wiek pacjentów wynosił 63 lata. Było to randomizowane badanie z podwójnie ślepą próbą. Pacjentów podzielono na dwie grupy, przy czym osoby włączone do grupy badawczej otrzymywały 140 mg ewolokumabu podskórnym co dwa tygodnie lub 420 mg raz w miesiącu (13 784 osób), zaś osoby zakwalifikowane do grupy kontrolnej otrzymywały placebo (13 780 osób). Po okresie trwającym 48 tygodni średnia redukcja stężenia LDL-C w grupie badawczej wynosiła 59% względem grupy kontrolnej (u 87% chorych otrzymujących ewolokumab stężenie LDL-C obniżyło się do wartości równej 70 mg/dl lub niższej, a u 42% badanych do wartości równej 25 mg/dl lub niższej). Pierwotny punkt końcowy (zgon z przyczyn sercowo-naczyniowych, zawał serca, udar mózgu, hospitalizacja z powodu niestabilnej dławicy piersiowej oraz rewaskularyzacja mięśnia sercowego) wystąpił u znacząco mniejszego odsetka osób w grupie badawczej niż w grupie kontrolnej (9,8% vs. 11,3%; HR 0,85; 95% CI: 0,79-0,92; $p < 0,001$). Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami w zakresie częstości wystąpienia działań niepożądanych [25].

Celem badania GAUSS-2 (*Goal Achievement after Utilizing an Anti-PCSK9 Antibody in Statin Intolerant Subjects*) była ocena skuteczności oraz bezpieczeństwa stosowania ewolokumabu w porównaniu z ezetymibem u osób chorujących na hipercholesterolemię. Było to randomizowane, kontrolowane placebo badanie kliniczne z podwójnie ślepą próbą, które trwało 12 tygodni. W badaniu brało udział 307 osób, które nie stosowały statyn lub stosowały statyny jedynie w małych dawkach. Uczestników badania podzielono na cztery grupy: 103 osoby otrzymywały ewolokumab w dawce 140 mg podskórnym co 2 tygodnie oraz placebo doustnie codziennie, 102 osoby otrzymywały ewolokumab w dawce 420 mg podskórnym raz w miesiącu oraz placebo doustnie codziennie, 51 osób otrzymywało ezetymib codziennie oraz placebo podskórnym co 2 tygodnie, zaś kolejne 51 osób otrzymywało ezetymib codziennie oraz placebo podskórnym raz w miesiącu. Wyjściowe średnie stężenie LDL-C wynosiło 193 ± 59 mg/dl. Stwierdzono, że stosowanie ewolokumabu oraz placebo wiąże się z obniżeniem stężenia LDL-C odpowiednio o 56,1% (95% CI: 52,5-59,7%) w grupie przyjmującej 140 mg ewolokumabu co 2 tygodnie oraz o 55,3% (95% CI: 52,3-58,3%) w grupie stosującej 420 mg ewolokumab co miesiąc. Opisana redukcja stężenia LDL-C w grupach badawczych była istotnie wyższa niż w grupach kontrolnych, w których wynosiła odpowiednio 36,9% (95% CI: 31,6-42,3%) oraz 38,7% (95% CI: 34,3-43,1%) ($p < 0,001$). U 8% pacjentów przyjmujących ewolokumab wystąpiły bóle mięśniowe, zaś wśród

osób przyjmujących ezetymib ten odsetek wynosił 18%. Zdarzenia niepożądane doprowadziły do zaprzestania dalszego uczestnictwa w badaniu u 8% osób otrzymujących ewolokumab i u 13% osób stosujących ezetymib [26].

W randomizowanym badaniu klinicznym OLSER-1 (*Open-Label Study of Long-term Evaluation Against LDL-C*), rozpoczętym w 2011 roku i trwającym 5 lat, oceniano długoterminowe bezpieczeństwo oraz skuteczność ewolokumabu [27, 28]. Osoby włączone do grupy badawczej (882 osób) otrzymywały 420 mg ewolokumabu co miesiąc wraz z dotychczasową terapią hipolipemizującą, zaś osoby włączone do grupy kontrolnej (442 osób) otrzymywały wyłącznie standardową terapię farmakologiczną (SOC, ang. *standard of care*). W momencie randomizacji, a także przez 12 tygodni, wyniki stężeń lipidów były zaślepienie. Po 12 tygodniach badacze otrzymali wyniki badań laboratoryjnych i samodzielnie dostosowywali terapię SOC w obu grupach. Po roku pacjenci przyjmujący wyłącznie SOC mogli otrzymać ewolokumab. Po 52 tygodniach terapii stężenie LDL-C u chorych przyjmujących przeciwciało monoklonalne i SOC obniżyło się o 61% (95% CI: 60-63%) w stosunku do wartości początkowej, a przy stosowaniu jedynie SOC o 2% (95% CI: 0,2-5%). Mediana stężenia LDL-C w grupach badawczej i kontrolnej wynosiła odpowiednio 53 mg/dl oraz 133 mg/dl ($p < 0,001$). Nie wykryto przeciwciał neutralizujących ewolokumab. W grupie badawczej roczna częstość występowania nowych przypadków cukrzycy wyniosła 2,8%, zaś w grupie kontrolnej ten odsetek wynosił 4% [27].

Alirokumab został oceniony w badaniu ODYSSEY LONG TERM (*Long-term Safety and Tolerability of Alirocumab Versus Placebo on Top of Lipid-Modifying Therapy in High Cardiovascular Risk Patients With Hypercholesterolemia*) [20]. Wzięło w nim udział 2 341 osób o dużym ryzyku sercowo-naczyniowym, u których stężenie LDL-C przekraczało 70 mg/dl. 1 553 pacjentów włączonych do grupy badawczej otrzymywało alirokumab w dawce 150 mg co 2 tygodnie, a 788 osób z grupy kontrolnej przyjmowało placebo. U chorych przyjmujących przeciwciało monoklonalne po 78 tygodniach stosowanej terapii uzyskano redukcję stężenia LDL-C o 62% w porównaniu z osobami przyjmującymi placebo. Zdarzenia niepożądane, prowadzące do przerwania badania wystąpiły u 7,2% pacjentów, którzy otrzymali alirokumab i u 5,8% pacjentów, którzy otrzymali placebo. Zaobserwowano mniejszą częstość występowania zdarzeń sercowo-naczyniowych tj. choroby wieńcowej, zawału mięśnia sercowego, udaru niedokrwiennego mózgu, kończących się zgonem lub nie, oraz niestabilnej dławicy piersiowej wymagającej hospitalizacji w grupie badawczej (1,7%) niż w grupie kontrolnej (3,3%) [29].

W badaniu ODYSSEY OUTCOMES (*Evaluation of Cardiovascular Outcomes After an Acute Coronary Syndrome During Treatment With Alirocumab*) wzięło udział 18 924 pacjentów w wieku ≥ 40 lat, którzy doświadczyli ostrego zespołu wieńcowego od jednego do dwunastu miesięcy przed randomizacją i u których stężenie LDL-C wynosiło co najmniej 70 mg/dl, stężenie nie-HDL-C co najmniej 100 mg/dl lub stężenie apolipoproteiny B co najmniej 80 mg/dl w trakcie leczenia statyną o dużej intensywności [30, 31]. 9 462 pacjentów zostało włączonych do grupy badawczej (alirokumab w dawce 75 mg co dwa tygodnie), zaś kolejne 9 462 osób zostało włączonych do grupy kontrolnej (placebo). Mediana czasu obserwacji wynosiła 2,8 roku. Pierwszorzędowy punkt końcowy obejmował zgon z powodu choroby wieńcowej, zawał mięśnia sercowego, udar niedokrwienny mózgu ze skutkiem śmiertelnym lub bez, oraz niestabilną

dławicę piersiową wymagającą hospitalizacji. Pierwszorzędowy punkt końcowy wystąpił u 9,5% pacjentów w grupie badawczej oraz u 11,1% w grupie kontrolnej (HR 0,85; 95% CI: 0,78-0,93; $p < 0,001$) [31].

Inhibitory PCSK9 wpływają również na stężenie lipoproteiny(a), której zwiększone stężenie jest niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy i chorób układu sercowo-naczyniowego w jej przebiegu [29, 32]. W pracy opublikowanej przez Toth i wsp. przeanalizowano wyniki piętnastu badań klinicznych drugiej i trzeciej fazy dotyczących ewelokumabu, o czasie trwania od 12 tygodni do 5 lat, w których uczestniczyło łącznie 7 690 osób. W badaniach trwających 12 tygodni mediana zmiany stężenia lipoproteiny(a) wyrażonej w procentach mieściła się w zakresie od -21,2% do -33,3% z uwzględnieniem korekty względem placebo. W badaniach dłużej trwających analogiczny parameter mieścił się w zakresie od -23,8% do -33,3% (bez korekty względem grupy kontrolnej) [32].

W pracy opublikowanej przez Gaudet i wsp. zebrano dane z trzech randomizowanych, kontrolowanych placebo badań klinicznych drugiej fazy z próbą podwójnie ślepą trwających 8 lub 12 tygodni, dotyczących skuteczności i bezpieczeństwa alirokumabu. Stwierdzono, że przyjmowanie alirokumabu wiąże się ze zmniejszeniem stężenia lipoproteiny(a) o około 30%, a różnica w stosunku do grupy kontrolnej jest istotna statystycznie ($p < 0,0001$) [33].

Do działań niepożądanych obu przeciwciał zalicza się bóle mięśniowe, objawy grypopodobne, zapalenie jamy nosowo-gardłowej, łagodne reakcje w miejscu wstrzyknięcia [17].

4. Białka podobne do angiopoetyny (ANGPTL)

Białka ANGPTL odgrywają istotną rolę w kontroli stężenia triglicerydów we krwi w zależności m.in. od stanu odżywienia. Po posiłku aktywność lipazy lipoproteinowej (LPL, ang. *lipoprotein lipase*) jest zwiększona w białej tkance tłuszczowej, a zmniejszona w mięśniach szkieletowych oraz sercu, zaś w czasie głodzenia odwrotnie. Wykazano, że ANGPTL3 razem z ANGPTL4 i ANGPTL8 obniżają aktywność LPL poprzez zmianę jej konformacji z homodimerycznej, która jest aktywna biologicznie, do monomerycznej nieaktywnej biologicznie. Opisana zmiana konformacji obniża powinowactwo cząsteczki LPL do zakotwiczonego w glikozylofosfatydyloinozytolu białka 1 wiążącego lipoproteiny o wysokiej gęstości, które jest odpowiedzialne za jej stabilizację. Do tej pory nie zidentyfikowano czynników pobudzających ekspresję powyższych białek w zależności od stanu odżywienia [34].

ANGPTL3 wchodzi w skład rodziny czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) [34], a głównym źródłem tego białka jest wątroba [34, 35]. Zmniejszenie aktywność białka ANGPTL3 prowadzi do zmiany profilu lipidowego na korzystniejszy z perspektywy profilaktyki chorób układu sercowo-naczyniowego [35]. W kilku badaniach wykazano, że mutacje ANGPTL3 związane z ich mniejszą aktywnością działają ochronnie na układ sercowo-naczyniowy. Mutacje typu utraty funkcji (ang. *loss-of-function*) genów *ANGPTL3* i *ANGPTL4* powodują zmniejszenie ryzyka wystąpienia choroby niedokrwiennej serca i cukrzycy typu 2. Sugerowano również, że stężenia białek ANGPTL3, ANGPTL4 i ANGPTL8 mogą stanowić biomarkery przydatne w ocenie ryzyka sercowo-naczyniowego [34].



5. Ewinakumab

Ewinakumab (Evkeeza®) został opracowany do leczenia homozygotycznej hipercholesterolemii rodzinnej (HoFH, ang. *homozygous familial hypercholesterolemia*), a także odpornej na dotychczasowe leczenie hipercholesterolemii oraz ciężkiej hipertriglicydemii [36]. Preparat ten uzyskał pierwsze dopuszczenie do obrotu w USA w dniu 11 lutego 2021 roku do stosowania jako uzupełnienie innych terapii obniżających stężenie LDL-C w leczeniu dorosłych i dzieci powyżej dwunastego roku życia z HoFH [34, 35].

Ewinakumab jest humanizowanym przeciwciałem monoklonalnym [34], które hamuje aktywność ANGPTL3 i przyczynia się do zmniejszania stężenia LDL-C, HDL-C, TG, apolipoproteiny B i apolipoproteiny A-I [37]. Zalecana dawka preparatu wynosi 15 mg na kilogram masy ciała podawana dożylnie co 4 tygodnie [38].

Raal i wsp. w badaniu randomizowanym trzeciej fazy ELIPSE-HoHF (*Evinacumab Lipid Studies in Patients with Homozygous Familial Hypercholesterolemia*) ocenili skuteczność ewinakumabu u 65 chorych z rozpozną homozygotyczną hipercholesterolemią rodzinną. Kryterium włączenia do badania było stosowanie leczenia hipolipemizującego w maksymalnej tolerowanej dawce oraz aktualne stężenie LDL-C na poziomie co najmniej 70 mg/dl. W grupie otrzymującej ewinakumab średnie stężenie LDL-C wynosiło 260 mg/dl, a w grupie otrzymującej placebo 247 mg/dl. Pacjentów zakwalifikowano do przyjmowania ewinakumabu w dawce 15 mg na kilogram masy ciała dożylnie co 4 tygodnie (43 osoby) lub placebo (22 osoby). Po 24 tygodniach zaobserwowano redukcję stężenia LDL-C o 47,1% w grupie osób otrzymujących ewinakumab w porównaniu ze zwiększeniem o 1,9% w grupie placebo. U żadnego z pacjentów nie było konieczne odstawienie leku ani placebo z powodu działań niepożądanych. U żadnego z pacjentów w czasie trwania badania nie stwierdzono obecności we krwi przeciwciał przeciwlękowych [39].

W badaniu na zwierzętach oceniono bezpieczeństwo stosowania ewinakumabu w ciąży. Powodował on wady rozwojowe płodu u ciężarnych królików, ale nie szczurów. Należy zatem unikać stosowania ewinakumabu u kobiet w ciąży [38].

Potrzebne są dalsze badania, które odpowiedzą na pytanie czy stosowanie ewinakumabu wpływa na redukcję ryzyka wystąpienia zdarzeń sercowo-naczyniowych.

6. Podsumowanie

Farmakoterapia dyslipidemii odgrywa istotną rolę we współczesnej medycynie. Zaburzenia gospodarki lipidowej stanowią jeden z najistotniejszych modyfikowalnych czynników ryzyka sercowo-naczyniowego, zaś choroby układu sercowo-naczyniowego stanowią jedną z najważniejszych przyczyn zgonów na świecie.

Wprowadzenie do rutynowej praktyki klinicznej przeciwciał monoklonalnych stanowiło istotny przełom w leczeniu dyslipidemii. Do przeciwciał monoklonalnych dopuszczonych do użytku w rutynowej praktyce klinicznej należą dwie grupy leków: inhibitory PCSK9 (alirokumab i ewolokumab) oraz przeciwciało hamujące aktywność ANGPTL3 (ewinakumab).

Dotychczas przeprowadzone badania kliniczne wykazały, że wspomniane substancje cechują się dobrym profilem skuteczności i bezpieczeństwa. Ponadto w przypadku inhibitorów PCSK9 wykazano korzystny wpływ na ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych, zaś w przypadku ewinakumabu konieczne są dalsze badania w tym zakresie.

Stosowanie tych leków może zatem przyczynić się do poprawy efektywności leczenia pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego, przede wszystkim zaś chorych z hipercholesterolemią rodzinną, pacjentów nietolerujących statyn oraz chorych, dla których dotychczasowe możliwości leczenia hipolipemizującego nie pozwalały na osiągnięcie docelowych wartości parametrów gospodarki lipidowej.

Literatura

1. Berberich A.J., Hegele R.A., *A Modern Approach to Dyslipidemia*, Endocrine Reviews, 2021.
2. Fodor G., *Primary Prevention of CVD: Treating Dyslipidemia*, American Family Physician, 83(10), 2011, s. 1207-1208.
3. Piotr M., *Czynniki ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego na podstawie badań pacjentów poradni POZ*, Poznań 2013.
4. Jakubiak G.K., Pawlas N., Cieślak G., Stanek A., *Chronic lower extremity ischemia and its association with the frailty syndrome in patients with diabetes*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 17, 2020, s. 9339.
5. Zdrojewski T., Solnica B., Cybulska B., Bandosz P., Rutkowski M., Stokwiszewski J., Gaciong Z., Banach M., Wojtyniak B., Pencina M., Wyrzykowski B., *Prevalence of lipid abnormalities in Poland. The NATPOL 2011 survey*, Kardiologia Polska, 74(3), 2016, s. 213-223.
6. Pająk A., Szafraniec K., Polak M., Polakowska M., Kozela M., Piotrowski W., Kwaśniewska M., Podolecka E., Kozakiewicz K., Tykarski A., Zdrojewski T., Drygas W., WOBASZ Investigators., *Changes in the prevalence, treatment, and control of hypercholesterolemia and other dyslipidemias over 10 years in Poland: the WOBASZ study*, Pol Arch Med Wewn, 126(9), 2016, s. 642-652.
7. Szymański F. M., Barylski M., Cybulska B., Woźakowska-Kapłon B., Krasieński Z., Mamcarz A., Widecka K., Płatek A. E., Dudek D., Mickiewicz A., Kobayashi A., Dzida G., Grajek S., Wehnicki M., Zubilewicz T., Ufnal M., Hering D., Mizia-Stec K., Kasprzak J., Kosiński M., Imiela J., Narkiewicz K., Gorczyca I., Postuła M., Jaguszewski M.J., Filipiak K.J., *Rekomendacje dotyczące leczenia dyslipidemii w Polsce – III Deklaracja Sopocka. Interdyscyplinarne stanowisko grupy ekspertów wsparte przez Sekcję Farmakoterapii Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego*, Choroby Serca i Naczyń, 15(4), 2018, s. 199-210.
8. Banach M., Burchardt P., Chlebus K., Dobrowolski P., Dudek D., Dyrbuś K., Gąsior M., Jankowski P., Jóźwiak J., Kłosiewicz-Latoszek L., Kowalska I., Małecki M., Prejbisz A., Rakowski M., Rysz J., Solnica B., Sitkiewicz D., Sygitowicz G., Sypniewska G., Tomasik T., Windak A., Zozulińska-Ziółkiewicz D., Cybulska B., *WYTYCZNE PTL/KLRwP/PTK/PTDL/PTD/PTNT DIAGNOSTYKI I LECZENIA ZABURZEŃ LIPIDOWYCH W POLSCE 2021*, Lekarz POZ Suplement, 2021.
9. Shehab A., Elnour A.A., Bhagavathula A.S., Kurian J.P., Hassan G., AlZaabi S., Gilbert H., Al-Rasadi K., *A Multicenter Prospective Hospital-based Cohort Study on the Efficacy and Safety of Pitavastatin*, Current Diabetes Reviews, 17(7), 2021.
10. Jakubiak G.K., Cieślak G., Stanek A., Pawlas N., *Homozygotyczna hipercholesterolemia rodzinna – epidemiologia, patogeneza i diagnostyka*, [W:] Danielewska A., Maciąg M. (red.), *Choroby rzadkie wyzwaniem dla współczesnej medycyny – najnowsze doniesienia*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2020, s. 20-28.
11. Jakubiak G.K., Cieślak G., Stanek A., Pawlas N., *Leczenie homozygotycznej hipercholesterolemii rodzinnej – obecne możliwości i perspektywy na przyszłość*, [W:] Danielewska A., Maciąg M. (red.), *Choroby rzadkie wyzwaniem dla współczesnej medycyny – najnowsze doniesienia*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin 2020, s. 29-38.

12. Mickiewicz A., Marłęga-Linert J., Fijałkowski M., Szymański F., Filipiak K.J., Gruchała M., *Inklisiran – rewolucja w leczeniu hipercholesterolemii?*, Kardiologia Inwazyjna, 16(4), 2021, s. 150-154.
13. Parolini C., *Biotechnology Approaches for the Treatment of Dyslipidemia*, Cardiovascular Drugs and Therapy, 35, 2021, s. 167-183.
14. Pstrągowski M., Bujalska-Zadrożny M., Cegielska-Perun K., *Znaczenie glikoproteiny PCSK9 w farmakoterapii hipercholesterolemii rodzinnej*, Choroby Serca i Naczyń, 10(2), 2013, s. 72-77.
15. Dong Y., Meng F., Wang Z., Yu T., Chen A., Xu S., Wang J., Yin M., Tang L., Hu C., Wang H., Cai J., *Construction and application of a human scFv phage display library based on Cre-LoxP recombination for anti-PCSK9 antibody selection*, International Journal of Molecular Medicine, 47(2), 2021, s. 708-718.
16. Wiciński M., Żak J., Malinowski B., Popek G., Grzešek G., *PCSK9 signaling pathways and their potential importance in clinical practice*, EPMA Journal, 8(4), 2017, s. 391-402. doi:10.1007/s13167-017-0106-6
17. Rosenson RS., Hegele RA., Fazio S., Cannon CP., *The Evolving Future of PCSK9 Inhibitors*, Journal of the American College of Cardiology, 72(3), 2018, s. 314-329.
18. Jakubiak G., *Inhibitory PCSK9 – nowy kierunek farmakoterapii dyslipidemii*, Lek w Polsce, 26(3-4), 2016, s. 70-76.
19. Mach F., Baigent C., Catapano A.L., Koskinas K.C., Casula M., Badimon L., Chapman M.J., De Backer G.G., Delgado V., Ference B.A., Graham I.M., Halliday A., Landmesser U., Mihaylova B., Pedersen T.R., Riccardi G., Richter D.J., Sabatine M.S., Taskinen M.R., Tokgozoglul., Wiklund O., ESC Scientific Document Group, *2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk*, European Heart Journal, 41(1), 2020, s. 111-188.
20. Bednarkiewicz Z., Kasprzak J. D., Bednarkiewicz J., *Inhibitory konwertazy proproteinowej subtilizyny/kexiny 9 (PCSK-9) – nowe możliwości leczenia zaburzeń lipidowych*, Folia Cardiologica, 12(5), 2017, s. 528-532.
21. Zhang J., Tecson K.M., Rocha N.A., McCullough P.A., *Usefulness of alirocumab and evolocumab for the treatment of patients with diabetic dyslipidemia*, Baylor University Medical Center Proceedings, 31(2), 2018, s. 180-184.
22. Wang E.Q., Bukowski J.F., Yunis C., Shear C.L., Ridker P.M., Schwartz P.F., Baltrukonis D., *Assessing the Potential Risk of Cross-Reactivity Between Anti-Bococizumab Antibodies and Other Anti-PCSK9 Monoclonal Antibodies*, Biodrugs, 33(5), 2019, s. 571-579.
23. Ridker P.M., Revkin J., Amarenco P., Brunell R., Curto M., Curto F., Flather M., Glynn R.J., Gregoire J., Jukema J.W., Karpov Y., Kastelein J.J.P., Koenig W., Lorenzatti A., Manga P., Masiukiewicz U., Miller M., Mosterd A., Murin J., Nicolau J.C., Nissen S., Ponikowski P., Santos R.D., Schwartz P.F., Soran H., White H., Wright R.S., Vrablik M., Yunis C., Shear C.L., Tardif J. C., *Cardiovascular Efficacy and Safety of Bococizumab in High-Risk Patients*, New England Journal of Medicine, 376(16), 2017, s. 1527-1539.
24. Kasichayanula S., Grover A., Emery M. G., Gibbs M. A., Somaratne R., Wasserman S. M., Gibbs J.P., *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Evolocumab, a PCSK9 Inhibitor*, Clinical Pharmacokinetics, 57(7), 2018, s. 769-779.
25. Sabatine M.S., Giugliano R.P., Keech A.C., Honarpour N., Wiviott S.D., Murphy S.A., Kuder J.F., Wang H., Liu T., Wasserman S.M., Sever P.S., Pedersen T.R., *Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease*, New England Journal of Medicine, 376(18), 2017, s. 1713-1722.
26. Stroes E., Colquhoun D., Sullivan D., Civeira F., Rosenson R.S., Watts G.F., Bruckert E., Cho L., Dent R., Knusel B., Xue A., Scott R., Wasserman S.M., Rocco M., *Anti-PCSK9 Antibody Effectively Lowers Cholesterol in Patients With Statin Intolerance: the GAUSS-2*

- randomized, placebo-controlled phase 3 clinical trial of evolocumab, *Journal of the American College of Cardiology*, 63(23), 2014, s. 2541-2548.
27. Koren M.J., Sabatine M.S., Giugliano R.P., Langslet G., Wiviott S.D., Kassahun H., Ruzza A., Ma Y., Somaratne R., Raal F.J., *Long-term Low-Density Lipoprotein Cholesterol-Lowering Efficacy, Persistence, and Safety of Evolocumab in Treatment of Hypercholesterolemia: Results Up to 4 Years From the Open-Label OSLER-1 Extension Study*, *JAMA cardiology*, 2(6), 2017, s. 598-607.
 28. Koren M.J., Sabatine M.S., Giugliano R.P., Langslet G., Wiviott S.D., Ruzza A., Ma Y., Hamer A.W., Wasserman S.M., Raal F.J., *Long-Term Efficacy and Safety of Evolocumab in Patients With Hypercholesterolemia*, *Journal of the American College of Cardiology*, 74(17), 2019, s. 2132-2146.
 29. Robinson J.G., Farnier M., Krempf M., Bergeron J., Luc G., Averna M., Stroes E.S., Langslet G., Raal F. J., Shahawy M. E., Koren M. J., Lepor N. E., Lorenzato C., Pordy R., Chaudhari U., Kastelein J.J.P., *Efficacy and Safety of Alirocumab in Reducing Lipids and Cardiovascular Events*, *New England Journal of Medicine*, 372(16), 2015, s. 1489-1499.
 30. Bittner V.A., Szarek M., Aylward P.E., Bhatt D.L., Diaz R., Edelberg J.M., Fras Z., Goodman S.G., Halvorsen S., Hanotin C., Harrington R.A., Jukema J.W., Loizeau V., Moriarty P.M., Moryusef A., Pordy R., Roe M.T., Sinnaeve P., Tsimikas S., Vogel R., White H.D., Zahger D., Zeiher A.M., Steg P.G., Schwartz G.G., *Effect of Alirocumab on Lipoprotein(a) and Cardiovascular Risk After Acute Coronary Syndrome*, *Journal of the American College of Cardiology*, 75(2), 2020, s. 133-144.
 31. Schwartz G.G., Steg P.G., Szarek M., Bhatt D.L., Bittner V.A., Diaz R., Edelberg J.M., Goodman S.G., Hanotin C., Harrington R.A., Jukema J.W., Lecorps G., Mahaffey K.W., Moryusef A., Pordy R., Quintero K., Roe M.T., Sasiela W.J., Tamby J.F., Tricoci P., White H.D., Zeiher A.M., *Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome*, *New England Journal of Medicine*, 379(22), 2018, s. 2097-2107.
 32. Toth P.P., Jones S.R., Monsalvo M.L., Elliott-Davey M., López J.A.G., Banach M., *Effect of Evolocumab on Non-High-Density Lipoprotein Cholesterol, Apolipoprotein B, and Lipoprotein(a): A Pooled Analysis of Phase 2 and Phase 3 Studies*, *Journal of the American Heart Association*, 9(5), 2020.
 33. Gaudet D., Kereiakes D. J., McKenney J. M., Roth E. M., Hanotin C., Gipe D., Du Y., Ferrand A. C., Ginsberg H. N., Stein E. A., *Effect of Alirocumab, a Monoclonal Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin 9 Antibody, on Lipoprotein(a) Concentrations (a Pooled Analysis of 150 mg Every Two Weeks Dosing from Phase 2 Trials)*, *The American Journal of Cardiology*, 114(5), 2014, s. 711-715.
 34. Surma S., Romańczyk M., Filipiak K.J., *Evinacumab – inhibitor ANGPTL3 – nowy lek w terapii zaburzeń lipidowych, Przegląd literatury i badań klinicznych*, *Folia Cardiologica*, 16(1), 2021, s. 40-50.
 35. Kopeć B., Sikora M., Zgutka K., Pawlik A., Piotrowska K., *Białka angiopoetynopodobne – rola fizjologiczna i udział w cukrzycy oraz jej powikłaniach*, *Postępy Biologii Komórki*, 46(3), 2019, s. 317-330.
 36. Markham A., *Evinacumab: First Approval*, *Drugs*, 81(9), 2021, s. 1101-1105.
 37. Reeskamp L.F., Millar J.S., Wu L., Jansen H., van Harskamp D., Schierbeek H., Gipe D.A., Rader D.J., Dallinga-Thie G.M., Hoving G.K., Cuchel M., *ANGPTL3 Inhibition With Evinacumab Results in Faster Clearance of IDL and LDL apoB in Patients With Homozygous Familial Hypercholesterolemia, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 41(5), 2021, s. 1753-1759.
 38. Warden B.A., Duell P.B., *Evinacumab for treatment of familial hypercholesterolemia*, *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 19(8), 2021, s. 739-751.
 39. Raal F.J., Rosenson R.S., Reeskamp L.F., Hovingh G.K., Kastelein J.J.P., Rubba P., Ali S., Banerjee P., Chan K.C., Gipe D.A., Khilla N., Pordy R., Weinreich D.M., Yancopoulos G.D., Zhang Y., Gaudet D., ELIPSE HoFH Investigators, *Evinacumab for Homozygous Familial Hypercholesterolemia*, *New England Journal of Medicine*, 383(8), 2020, s. 711-720.

Przeciwciała monoklonalne w leczeniu dyslipidemii – aktualne możliwości

Streszczenie

Dyslipidemia, która według wyników badań epidemiologicznych dotyczy ponad 60% osób mieszkających w Polsce, jest modyfikowalnym czynnikiem ryzyka rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego. Mimo dostępności w praktyce klinicznej kilku grup leków hipolipemizujących, u części chorych nie udaje się osiągnąć docelowych wartości parametrów gospodarki lipidowej. Duży przełom w farmakoterapii dyslipidemii stanowiło wprowadzenie przeciwciał monoklonalnych, takich jak ewolokumab, alirokumab oraz ewinakumab. Ewolokumab i alirokumab są inhibitorami konwertazy białkowej subtylizyny/keksyny typu 9 (inhibitory PCSK9), które powodują redukcję stężenia LDL-C o około 60%. Oba przeciwciała monoklonalne zostały zarejestrowane w 2015 roku. Ewinakumab jest inhibitorem białka 3 podobnego do angiopoetyny (inhibitor ANGPTL3) i został dopuszczony do użytku w praktyce klinicznej w 2021 roku. Według przeprowadzonych badań obniża on wartości LDL-C o ponad 45%. Ewolokumab, alirokumab oraz ewinakumab cechują się również zadowalającym profilem bezpieczeństwa. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie wyników przeglądu literatury w zakresie najważniejszych oraz aktualnych informacji na temat właściwości farmakologicznych i zastosowania przeciwciał monoklonalnych w leczeniu dyslipidemii.

Słowa kluczowe: dyslipidemia, PCSK9, ANGPTL3, ewolokumab, alirocumab, ewinacumab

Monoclonal antibodies in the treatment of dyslipidemia – current options

Abstract

Dyslipidemia, which according to epidemiological studies, affects more than 60% of people living in Poland, is a modifiable risk factor for cardiovascular disease. Despite the availability of several hypolipemic drugs in clinical practice, some patients fail to achieve target values of lipid parameters. A major breakthrough in pharmacotherapy of dyslipidemia was the introduction of monoclonal antibodies such as evolocumab, alirocumab and evinacumab. Evolocumab and alirocumab are subtilisin/kexin type 9 protein convertase inhibitors (PCSK9 inhibitors) that result in a reduction in LDL-C levels of approximately 60%. Both monoclonal antibodies were registered in 2015. Evinacumab is an angiopoietin-like protein 3 inhibitor (ANGPTL3 inhibitor) and was approved for use in clinical practice in 2021. According to studies, it lowers LDL-C values by more than 45%. Evolocumab, alirocumab and evinacumab also have a satisfactory safety profile. The purpose of this paper is to present the results of a literature review of the most important and current information on the pharmacological properties and use of monoclonal antibodies in the treatment of dyslipidemia.

Keywords: dyslipidemia, PCSK9, ANGPTL3, evolocumab, alirocumab, evinacumab

Techniki stosowane do analizy mikrobiomu osób z fenyloketonurią

1. Wprowadzenie

Badania nad bakteriami bytującymi w danej niszy organizmu pozwalają na uzyskanie wartościowych informacji m.in. o trybie życia danego organizmu, przebytych chorobach, które mogą znacząco wpływać na zmiany w mikrobiomie człowieka. Choroby genetyczne, a szczególnie będące wrodzonymi wadami metabolizmu (IEM, ang. *inborn errors of metabolism*) mają wpływ na zawartość mikrobiomu, w zależności od miejsca występowania konkretnego gatunku, rodziny czy rodzaju bakterii. Fenyloketonuria (ang. *phenylketonuria*, PKU) jest chorobą metaboliczną związaną m.in. z defektem w genie hydroksylazy fenyloalaniny (PAH, ang. *phenylalanine hydroxylase*), który koduje enzym odpowiedzialny za przemianę fenyloalaniny do tyrozyny. Gen ten znajduje się na ramieniu długim chromosomu 12. na prążku 24. Choroba PKU jest dziedziczona w sposób autosomalny recesywny. Podłoże molekularne nie jest do końca poznane ze względu na licznie występujące mutacje m.in. w genie *PAH*. Współczesna biotechnologia oraz bioinżynieria dostarczają nowych, bardziej zaawansowanych narzędzi do sekwencjonowania materiału genetycznego: DNA czy RNA, z próbek pochodzących np: ze śliny, kału, krwi czy bloczków parafinowych. Wiele takich metod opiera się na podstawowych elementach biologii molekularnej, które zostały ostatecznie przekształcone w bardziej zaawansowane narzędzia pod względem technologicznym, jak i informatycznym. W zależności od pochodzenia próbki, np. czy to jest próbka śliny, kału lub wymazu z innej części przewodu pokarmowego ludzi, obszary te zasiedlają różne gatunki bakterii. Spowodowane jest to procesami jakie zachodzą w przewodzie pokarmowym człowieka, a także dostępnością składników odżywczych niezbędnych do bytowania dla bakterii środowiskowych, np. liczną rodziną zasiedlającą jelito osób z fenyloketonurią są bakterie *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actionobateria* w porównaniu z grupą kontrolną (bez fenyloketonurii).

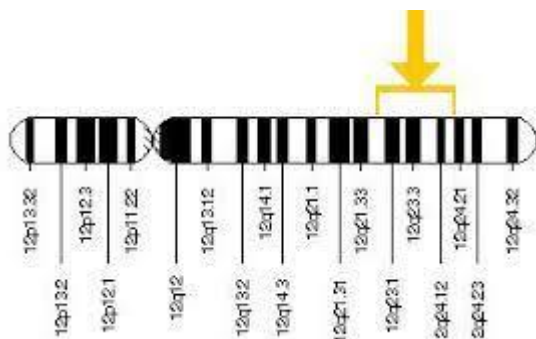
2. Fenyloketonuria

Fenyloketonuria jest genetyczną chorobą metaboliczną, która związana jest m.in. z mutacjami w genie kodującym enzym hydroksylazę fenyloalaniny lub z niedoborem tetrahydrobiopteryny, kofaktora PAH. PKU należy do grupy chorób określonych jako wrodzone wady metabolizmu. Skutkiem tej choroby jest nagromadzenia się podwyższonego poziomu fenyloalaniny we krwi i tkankach, co może działać toksycznie na organizm, powodując niepełnosprawność intelektualną oraz opóźnienie mowy u dzieci we wczesnych etapach rozwoju w przypadku klasycznej fenyloketonurii. Zbyt późne rozpoznanie choroby powoduje liczne zmiany w układzie nerwowym prowadzące do

¹ agnieszka.vogt@wp.pl, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywności Człowieka, SKN BIOM, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

² malgorzata.ostrowska@up.lublin.pl, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywności Człowieka, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

zaburzeń w rozwoju dziecka. Fenyloketonuria była pierwszym poznany zaburzeniem metabolicznym i genetycznym dla którego leczenie w oparciu o odpowiednią dietę może zapobiec jego najbardziej niszczącym skutkom [1]. Poniżej przedstawiono rysunek chromosomu 12, zawierającego zidentyfikowane prążki i subprążki, w którym doszło do mutacji.



Rysunek 1. Mapowanie chromosomu 12 (<http://ghr.nlm.nih.gov/>)

Fenyloketonuria występuje bardzo rzadko, bo 1:7000 [2] urodzeń na całym świecie (zgodnie z danymi podanymi na stronie Ministerstwa Zdrowia). Nosicielstwo tej rzadkiej choroby stanowi niebezpieczeństwo dla zdrowia dziecka, więc zalecane są przesiewowe badania genetyczne dla wszystkich noworodków w ramach „Programu badań przesiewowych noworodków w Polsce w latach 2019-2022” finansowanego przez Ministerstwo Zdrowia.

Typowymi objawami fenyloketonurii są:

- opóźnienie umysłowe bez rozwoju mowy lub zainteresowania otoczeniem;
- nieprawidłowy chód;
- spastyczne odruchy;
- egzema;
- nietypowe zachowania [2].

W literaturze medycznej można znaleźć informacje dotyczące stopnia nasilenia fenyloalaninemii pod względem stosowanej dietoterapii, czyli terapii opartej na eliminowaniu z pożywienia czynnika wpływającego na metabolizm w tym przypadku fenyloalaniny.

Wpływ mutacji na aktywność enzymu PAH jest bardzo zróżnicowany, dlatego też PKU może występować w różnych postaciach co przedstawia poniższa tabela.

Tabela 2 Zależność stężenia fenyloalaniny od kwalifikacji fenyloketonurii [4]

Klasa PKU	Aktywność PAH w białkach wątroby - % zawartości prawidłowej	Stężenie fenyloalaniny w surowicy krwi przed leczeniem ($\mu\text{mol}/\text{mg}\%$)
łagodna	3-6	<600/10
umiarkowana	1-3	600-1200/10-20
klasyczna	<1	>1200/20

Wszystkie podziały dotyczące PKUsą jednak modyfikowane i nowelizowane ze względu na postępujące badania genetyczne nad fenyloketonurią i odkrywaniem nowych wariantów mutacji genu *PAH* [3, 5]. Jak wykazują badania prowadzone przez wiele zespołów naukowych z całego świata, fenyloketonuria nie jest prostą chorobą o mendlowskim prawie dziedziczenia, lecz bardzo złożoną jednostką dziedziczną, której badania genetyczne mogą pozwolić na uzyskanie bardziej dokładnych danych z tego zakresu i pomóc w dostosowywaniu optymalnego sposobu leczenia. Szczegółowa charakterystyka mutacji w określonych populacjach nie tylko odgrywa kluczową rolę w potwierdzeniu choroby, fenotypu i przewidywaniu leczenia, ale także stanowi użyteczne narzędzie w planowaniu i zarządzaniu przyszłymi badaniami klinicznymi. Dlatego też jest bardzo ważne, aby stale aktualizować informacje o genotypach pochodzących nawet z małych krajów [3].

Badania nad PKU ujawniły wiele zależności pomiędzy typem choroby a mutacjami. Wykorzystując metody diagnostyki molekularnej wykryto i udowodniono występowanie szerokiego spektrum mutacji w genie *PAH* [6].

3. Mikrobiom człowieka

Mikrobiom człowieka jest siedliskiem wielu gatunków bakterii pochodzących z różnych rodzin, ale także grzybów i wirusów. W zależności od badanej powierzchni ludzkich tkanek możemy określić różnorodność występujących na nich bakterii. Bakterie w tym przypadku tworzą tzw. biofilm, który pomaga im zasiedlać dane środowisko oraz tworzyć niszę ekologiczną dla innych bakterii z odrębnych gatunków. Tworzenie biofilmu w przypadku tkanek ludzkich lub nabłonków, np. nabłonek wyścielający jelita, postrzegane jest jako końcowy pożądany efekt leczenia. Na różnorodność bakterii, które występują w organizmie ludzkim ma wpływ wiele czynników, takich jak np.

- dieta;
- wiek;
- prowadzony tryb i styl życia;
- typ porodu;
- choroby;
- dodatkowe zakażenia bakteriami obligatoryjnymi;
- dysbioza mająca wieloczynnikowe pochodzenie;
- predyspozycje do zakażeń wirusowych lub bakteryjnych [7].

3.1. Różnica pomiędzy mikrobiomem i mikrobiotą

Od wielu lat pojęcia: mikrobiom i mikrobiota stosowane są zamiennie i często te dwa pojęcia mylone ze sobą. Mikrobiota są to taksony mikroorganizmów związane np.: z człowiekiem, natomiast mikrobiom to katalog tych mikroobów wraz z ich całym materiałem genetycznym, który zawierają te mikroorganizmy [8].

Lista bakterii jamy ustnej wraz z opisem ich charakterystyki i informacjami genomicznymi jest dostępna na stronie internetowej *Human Oral Microbiome Database* (<http://www.homd.org/>, eHOMG). Strona ta jest na bieżąco aktualizowana i posiada bardzo wiele informacji na temat bakterii zasiedlających ludzkie góme drogi pokarmowe i oddechowe, w tym jamę ustną, gardło, przewodów nosowy, zatoki i przełyk. Istnieją strony internetowe, które są pochodnymi strony eHOMG. Posiadają one wszystkie taksony mikroorganizmów z określonego fragmentu ludzkich tkanek zasiedlanych przez bakterie [7].



4. Techniki stosowane do analizy mikrobiomu osób z fenyloketonurią

Ogromna różnorodność mikroorganizmów znajdujących się na powierzchni oraz we wnętrzu ludzkiego organizmu sugeruje, że zbadanie tego obszaru wymaga kompleksowego, zaawansowanego technologicznie zestawu narzędzi umożliwiającego nowe odkrycia. Metody te pozwalają skorygować błędy odczytu a także z dużą precyzją oszacować występowanie poszczególnych grup taksonomicznych w hodowli bakterii. Szeroko stosowana strategia dekonwolucji kompleksu interakcji, zapewnienia możliwości poprawy ludzkiego zdrowia, jest ona tworzona przez triadę obejmując:

- wysokorozdzielczą, wysokoprecyzyjną i wysokoprzepustową analizę biomasy mikrobiologicznej wraz z analizami porównawczymi;
- testowanie hipotez w odpowiednich modelach systemów eksperymentalnych;
- badania interwencyjne u ludzi [9, 10].

Pierwszy typ badań powinien przynieść testowalne hipotezy odnoszące się do natury funkcji nadanych przez specyficzną mikrobiotę na ludzką fizjologię, jak i dlaczego te funkcje różnią się między jednostkami (szczególnie między osobami chorymi i zdrowymi), oraz ich wpływu na ludzkie zdrowie. Jednakże, aby sformułować konkretne hipotezy dotyczące badań mechanistycznych mających na celu zrozumienie zależności pomiędzy gospodarzem a mikroorganizmami, badania obserwacyjne powinny wskazać funkcje mikrobiomu oraz konkretne populacje drobnoustrojów, które je pełnią. Ponadto, badania te powinny zidentyfikować biologicznie istotne informacje na temat wskaźników obecnego stanu zdrowia gospodarza [9, 10].

4.1. Metoda oparta o sekwencjonowanie regionu 16S rRNA

Nową metodę sekwencjonowania mikroorganizmów zapoczątkował Carl Woese. Opisał on jako pierwszy filogenetyczne powiązania bakterii wykorzystując ewolucyjnie konserwowane sekwencje genomu bakteryjnego kodującego region 16S rRNA [11]. Wśród dziewięciu odrębnych hiperzmiennych regionów, odcinki: V1, V2, V3 i V4, warunkują dużą zmiennością tych regionów u bakterii. Regiony te zapewniają różnorodność mikrobiologiczną w świecie bakteryjnym pozwalając wyodrębnić różne szczepy tego samego gatunku.

Innymi regionami wykorzystywanymi do badania 16S rRNA są np.:

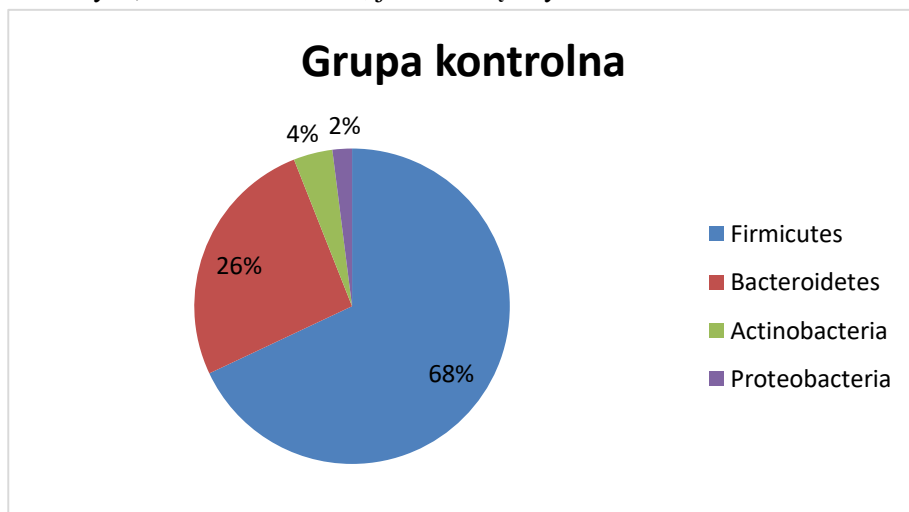
- Region V5 wykazuje najmniejszą zmienność ze wszystkich wyżej wymienionych regionów;
- Region V1 może być wykorzystywany do różnicowania pionierskich kolonizatorów jamy ustnej – *Streptococci*;
- Region V2 identyfikuje różne filotypy Gram-ujemnych bakterii *Porphyromonas* i *Fusobacterium*;
- Regiony V1-V3 wykazują dominację amplifikacji: *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonasi Bacteroides*;
- Regiony V4-V6 wykazują dominację: *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Enterococci* i *Campylobacter* [12].

Region V4-V6 jest uważany za najbardziej wiarygodny odcinek, który reprezentuje większą część genu 16S rRNA, który wykorzystywany jest do badania większości filogenów bakteryjnych, jednakże *Fusobacterium* nie udało się wykryć w tych odcinkach [12].

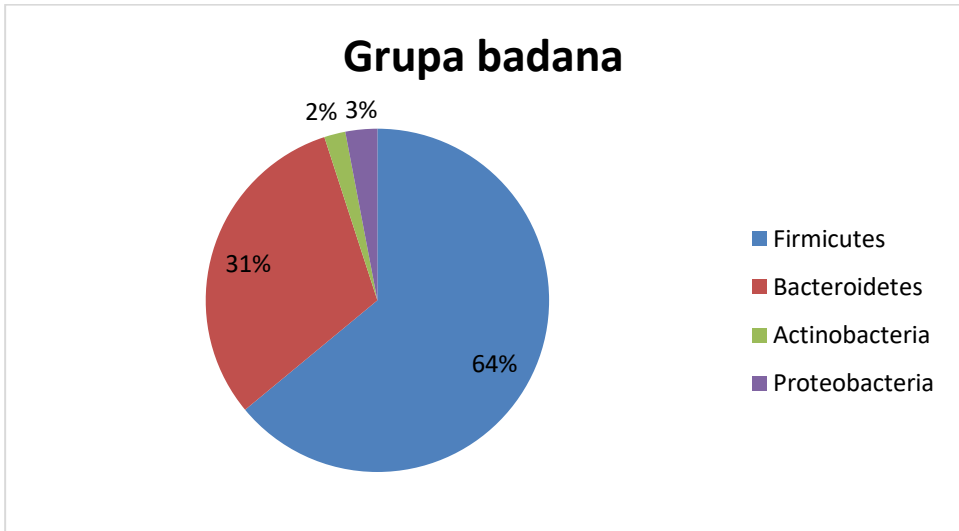
Częstym wyborem był region V1-V3, ale jego zastosowanie jest jak dotąd ograniczone do odczytów o długości do 750 par zasad (pz). Ponadto, region hiperzmienny V3-V4 został wykorzystany do sekwencjonowania na aparacie MiSeq (Illumina), który daje odczyty o długości 350 pz, co może pozwolić na dokładniejszą i tańszą charakterystykę próbek mikrobiomu. Region V4-V5 jest również tradycyjnie wykorzystywanym regionem hiperzmiennym w badaniach bioróżnorodności mikrobiomu opartych o 16S rRNA. Wcześniejsze badania wykazały, że wybór konkretnego regionu hiperzmiennego w sekwencjonowaniu 16S rRNA może istotnie zmienić postrzeganą strukturę społeczności mikrobiologicznej. W związku z tym, ocena wyboru regionów hiperzmiennych jest istotna, aby zminimalizować zniekształcenia oraz niezgodności w analizie opartej na sekwencji i porównaniach mikrobioty jamy ustnej i jelita [12, 13].

Mancilla i jego współpracownicy [14], wykorzystali metodę sekwencjonowania regionu V4 genu 16S rRNA w celu zbadania jak najszerszej gamy drobnoustrojów zasiedlających jelito grube osób dorosłych, bez żadnych chorób metabolicznych oraz osób chorych na fenylketonurię. Do tego eksperymentu zostały wykorzystane gotowe zestawy odczytników Nextera firmy Illumina, sekwencjonowanie oraz analiza uzyskanych wyników została przeprowadzona za pomocą sprzętu i oprogramowania firmy Illumina. Naukowcy za pomocą narzędzi platformy Illumina zdefiniowali 65 rodzaj mikroorganizmów. W próbkach PKU wykryto następujące rodzaje bakterii: *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Alistipes*, *Clostridium*, *Akkermansia* i *Bacteroides*. Alternatywnie, rodzaje, których populacja zmniejszyła się w próbkach PKU to *Lactobacillus*, *Porphyromonas*, *Frisingicoccus*, *Blautia*, i *Faecalibacterium* w porównaniu z próbkami kontrolnymi [14].

Na poniższych wykresach przedstawiono wyniki badań jakie uzyskano za pomocą sekwencjonowania regionu V4 genu 16S rRNA dla próbek pochodzących z kału osób chorych na PKU, jak i zdrowych. Jak można zauważyć największą grupę bakterii stanowią bakterie z rodziny *Firmicutes* w porównaniu z grupą kontrolną. Na wykresach przedstawiono 3 najważniejsze i najliczniejsze rodzaje mikroorganizmów zawartych w kale. Próbki badane pochodziły od dzieci natomiast grupa kontrolna pochodziła od osób dorosłych, zarówno od kobiet, jak i od mężczyzn.



Rysunek 2. Porównanie liczebności rodzin bakterii u osoby zdrowej wolnej od PKU



Rysunek 3. Porównanie liczebności rodzin bakterii u osoby chorej z PKU

Bassanini i wraz z współpracownikami [15] wykorzystwała metodę sekwencjonowania regionu V3 i V4 genu 16S rRNA w podobnym celu jak Mancilla [14]. Do tego celu użyto próbek kału pochodzących od dzieci z PKU w przedziale wiekowym od 37 do 42 tygodnia życia. Grupę kontrolną stanowiły dzieci, które nie były chore na PKU. Próbkę pobrano od obu płci. Do opracowania wyników wykorzystano metodę qPCR z wyznakowanymi starterami barwnikiem SYBERGreen komplementarnymi do matrycy bakterii *Methanobrevibacter smithii*. Wyniki opracowywano za pomocą platformy METLAB (Nitick, MA, USA). Największą grupą odczytaną po uzyskaniu wyników dla dzieci chorujących na PKU był rodzaj *Faecalibacterium*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidetes*, *Prevotellaw* porównaniu z kałem pochodzącym z grupy kontrolnej. Dzieci z grupy kontrolnej charakteryzowały się inną zawartością bakterii, np. bakterii z rodzaju *Blautia*, *Clostridium* i *Lachnospiracea* [16].

W wielu pracach opartych na analizie genu 16S rRNA badano również ważne czynniki, które mogą wpłynąć znacząco na odczytywanie sekwencji do których zaliczyć można:

- przechowywanie próbek przed ekstrakcją DNA;
- procedura ekstrakcji DNA (jakie etapy wchodziły w procedurę ekstrakcji oraz jakimi sposobami ekstrahowano próbkę);
- użyte startery;
- zastosowana platforma do sekwencjonowania;
- wybranie regionu hiperzmiennego do odczytania sekwencji na aparacie [16].

4.2. Technika MLPA

Metoda MLPA (ang. *multiplexligation-dependent probeamplification* – multiplexowa amplifikacja sond zależna od ligacji) jest szeroko stosowana do identyfikacji zmian w genach w ludzkich zaburzeniach genetycznych, które prowadzą do różnych chorób nowotworowych czy metabolicznych. Metoda ta jest wykorzystywana do identyfikacji tych zmian genetycznych, które są wynikiem mutacji punktowych, insercji,

delecji, duplikacji lub rekombinacji. Niezależnie od złożoności procesu projektowania sond, niezawodność i prostota tej metody sprawia, że można ją zastosować do każdego rodzaju DNA. Metodę tą można zastosować do analizy bakteryjnego 16S rRNA dla gatunków, które są już znane [14].

Zastosowanie MLPA daje zadowalające wyniki w jednoczesnej identyfikacji wybranych bakterii jamy ustnej z czystych kultur, grup znanych gatunków, jak również DNA uzyskanego z biofilmu i próbek śliny. Metodę tą także można wykorzystać do monitorowania zmian w środowisku jakim jest organizm ludzki i do badania zmian w diecie człowieka, które mogą znacząco wpłynąć na biofilm bakteryjny [14].

Terefework i wsp. [17], opracowali metodę identyfikacji bakterii tworzących biofilm bakterii zasiedlających jamę ustną. W tym celu próbki pobrane od dzieci zostały poddane amplifikacji MLPA. Startery pochodziły od 8 gatunków bakterii i ich szczepów charakterystycznych z każdej grupy: *Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Candida albicans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* i *Veillonella parvula*.

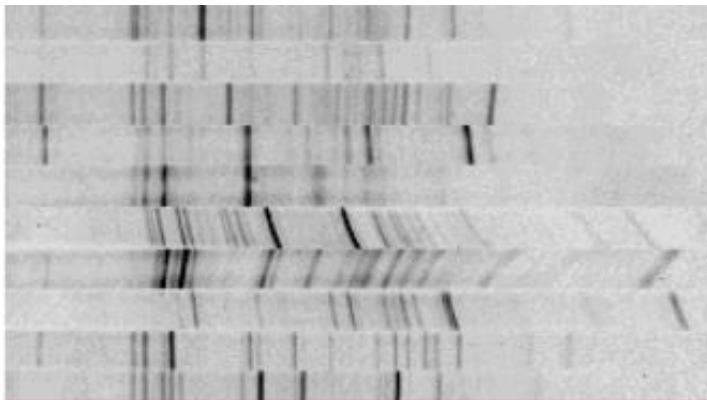
4.3. PCR-DGGE

Elektroforeza w żelu gradientu denaturującego (DGGE, ang. *Denaturing gradient gelelectrophoresis*) wykazała, że dynamika różnorodności wewnątrz społeczności mikrobiologicznej może być oceniana w celu określenia mikrobiologicznych różnic strukturalnych pomiędzy środowiskami i ich zmian w czasie [18].

Do metody tej pozyskiwano kałowe DNA i analizowano region V3 z sekwencji 16S rRNA. Analizę klasteryzacji przeprowadzono poprzez analizę skupień dla wszystkich punktów czasowych u wszystkich badanych w celu znalezienia korelacji [18].

Poszczególne wyniki wykazały wzrost liczby pasm z upływem miesięcy, co wskazuje na wzrost zróżnicowania i złożoności mikrobioty, a także różnic międzyosobniczych w profilach DGGE, bez zastosowania unikalnego wzorca. Jednakże profil PCR-DGGE każdego badanego ujawnił interesujący wzór podobieństwa między punktami czasowymi [18].

Poniższa fotografia przedstawia uzyskane wyniki po rozdzieleniu próbek na żelu od dzieci w wieku od 4 do 18 lat karmionych dietą pozbawioną fenyloalaniny [18].



Rysunek 4. Żel z PCR-DGGE obrazujący bakteryjne pochodzące z regionu V2-V3 genu 16S rRNA po reakcji qPCR [18]

4.4. Analiza sekwencjonowania nową technologią sekwencjonowania (NGS)

Sekwencjonowanie wybranych amplikonów jest szeroko stosowanym podejściem służącym do scharakteryzowania społeczności mikrobiologicznych. W tym przypadku DNA jest ekstrahowane z próbki (klinicznej) i poddawane amplifikacji PCR przy użyciu zestawu starterów PCR. Oligonukleotydy te, są ukierunkowane na taksonomicznie określony odcinek DNA, który jest wspólny dla prokariotów (bakterii i archaidów), albo wspólny dla mikroorganizmów eukariotycznych (grzybów lub protisty) – nie ma uniwersalnego genu docelowego obecnego zarówno w prokariotycznych, jak i eukariotycznych królestwach [19, 20].

Po amplifikacji, powstałe amplikony są sekwencjonowane, a następnie charakteryzowane przy użyciu narzędzi bioinformatycznych, które przeszukują bazy danych sekwencji referencyjnych w celu określenia, które mikroorganizmy są obecne w próbce i w jakiej względnej liczebności. Obecnie sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. *next-generation sequencing*) z wykorzystaniem najnowszych protokołów NGS opartych na różnych amplikonach umożliwia szerokie multipleksowanie próbek, pozwalając badaczom na przetwarzanie setek próbek i analizowanie milionów amplikonów PCR w pojedynczej analizie NGS [19, 20].

Zdecydowanie najpowszechniej stosowanym genem taksonomicznie informującym wykorzystywanym w NGS jest gen 16S rRNA, będący uznanym markerem genetycznym wykorzystywanym do identyfikacji i klasyfikacji prokariotów od czasów Woese'a i Foxa. Woese i Fox po raz pierwszy wykorzystali rRNA do zdefiniowania trzech domen życia w 1977 roku [11, 19].

Sekwencjonowanie genu 16S rRNA umożliwia badaczom na wnioskowanie o związkach filogenetycznych drobnoustrojów, ponieważ gen 16S rRNA koduje składnik RNA małej podjednostki (ang. *small subunit ribosomal unit*, SSU) rybosomów prokariotycznych, które pełnią istotne funkcje w procesie translacji oraz są odpowiedzialne za tworzenie i utrzymywanie prawidłowych korelacji między gatunkami. 16S rRNA występuje u wszystkich bakterii i Archea oraz charakteryzuje się wolnym tempem ewolucji. Sam gen 16S rRNA ma wielkość ok. 1500 par zasad (bp), a jego struktura genetyczna składa się z 9 wysoce konserwatywnych i 9 hiperzmiennych regionów (V1-V9) [19, 22]. Te konserwatywne regiony mogą służyć jako uniwersalne miejsca wiązania starterów do amplifikacji fragmentów genów metodą PCR, podczas gdy regiony hiperzmienne zawierają znacznie zróżnicowane sekwencje, przydatne do identyfikacji prokariotycznej. Poprzez porównanie tych regionów hiperzmiennych z sekwencjami genów 16S rRNA wskazanych szczepów prokariotycznych dostępnych w dużych publicznych bazach danych, takich jak SILVA [23], RDP [24], GreenGenes [25], czy NCBI [26] można sklasyfikować gatunki występujące w badanym materiale.

Naukowcy są w stanie dokonać dokładnej identyfikacji taksonów prokariotycznych obecnych w próbkach klinicznych. Należy jednak zauważyć, że dokładna identyfikacja taksonomiczna danych z genów 16S rRNA zależy od jakości i kompletności użytych baz referencyjnych. Większość referencyjnych baz danych zawiera pewną liczbę niezidentyfikowanych i/lub słabo opisanych sekwencji, a wszystkie referencyjne bazy danych są niekompletne. To często utrudnia dokonanie dokładnej klasyfikacji taksonomicznej sekwencji genu 16S rRNA. Co więcej, sekwencjonowanie częściowych genów 16S rRNA, które jest obecnie najczęściej stosowaną strategią profilowania mikrobioty, często nie ma wystarczającej mocy dyskryminacyjnej, aby rozróżnić sekwencje proka-



riotów na poziomie taksonomicznym gatunków i jest zwykle ograniczona do klasyfikacji na poziomie rodzaju. Z tego powodu stale poszukuje się alternatywnych genów markerowych, które mogą poprawić rozdzielczość filogenetyczną wśród gatunków prokariotycznych. Na przykład, analiza sekwencji genu *rpoB* wykazała wcześniej w porównaniu z 16S rRNA, poprawia zdolność dyskryminacyjną do scharakteryzowania gatunków prokariotycznych wśród kilku rodzin i rodzajów bakterii, m.in. *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, i in. Gen *rpoB* koduje wysoce konserwatywną podjednostkę beta prokariotycznej polimerazy RNA i najwyraźniej posiada te same kluczowe cechy, co gen 16S rRNA [19, 27].

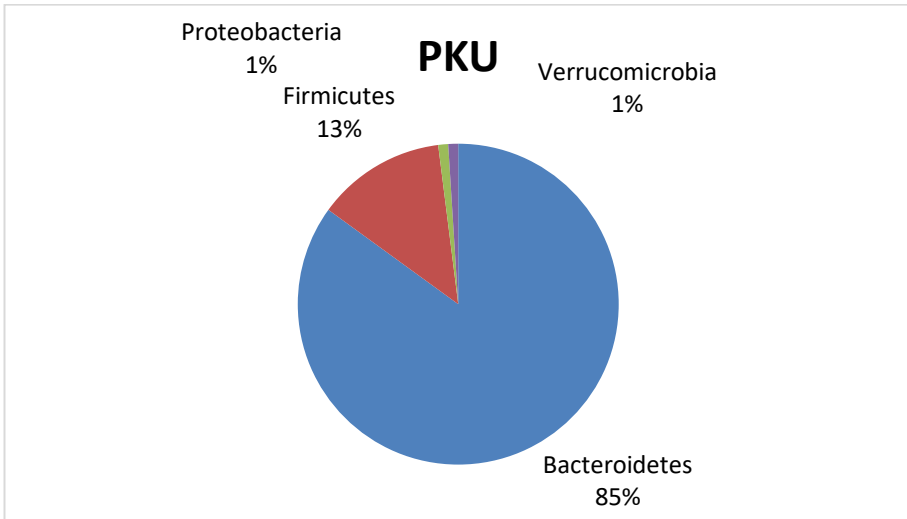
Lifi-Holgerson i wsp., za pomocą metody NGS przeanalizowali amplikony z powielenia regionu V3 i V4 genu 16S rRNA. Próbkę pochodziły od dzieci z przedziału wiekowego od 2 dni do 18 lat chorych na fenyloketonurię. Próbkę badane pochodziły od dzieci obu płci, tak samo jak próbki kontrolne. Materiał do badań był pobierany w sześciu grupach wiekowych:

1. 2 dni;
2. 3 miesiące;
3. 18 miesięcy;
4. 3 lata;
5. 5 lat;
6. 18 lat.

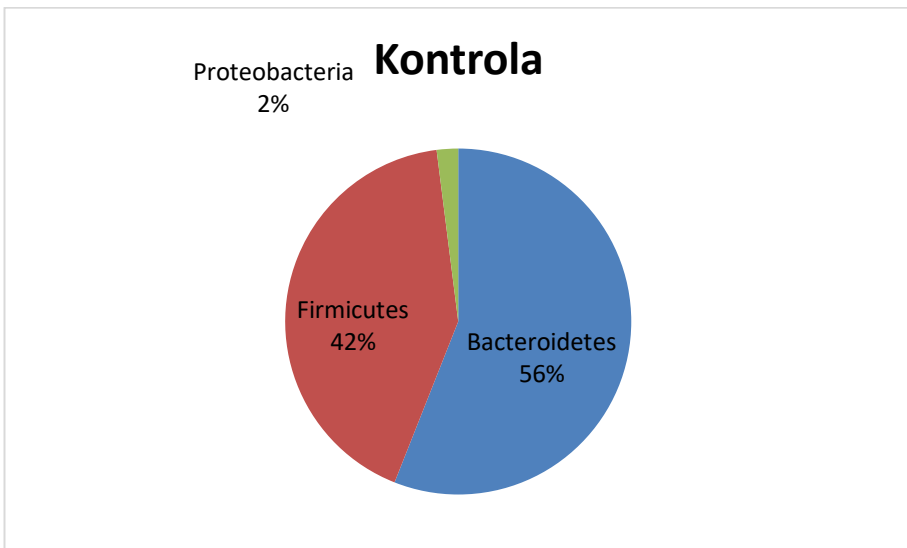
Badania te miały na celu ukazanie zasiedlania jamy ustnej bakterii dzieci chorych na fenyloketonurię w spektrum czasu [28]. Naukowcy zauważyli, że zmiana flory bakteryjnej dzieci na przestrzeni czasu zmienia się. Zawartość procentowa bakterii w początkowych latach życia zawierała największy odsetek bakterii z typu *Firmicutes*, *Bacteroidetes*. W okresie od 18 miesięcy do 18. r.ż. zawartość bakterii z typu *Firmicutes* spada a wzrastają w większej liczebności typ *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Fusobacteria*. Analiza zawartości rodzajowej na przestrzeni czasu od 18 miesięcy do 18. r.ż. wykazała, że największy odsetek bakterii stanowi: *Streptococcus*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, *Rothia*, *Gemella*. Skład microbioty jamy ustnej u wcześniej wspomnianego okresu życia jest bardziej zróżnicowany niż w przypadku dzieci młodszych. W okresie życia od 2 dni do 3 miesięcy największy odsetek rodzajowy bakterii stanowiły bakterie z rodzaju *Staphylococcus* w obu grupach czasowych i *Gemella*, która licznie występuje u dzieci w wieku dwóch dni. U dzieci w wieku 3 miesięcy można zauważyć wzrost różnorodności flory bakteryjnej śliny niż u dzieci, które mają 2 dni [28].

Poniższe wykresy przedstawiają badania zespołu naukowców pod przewodnictwem de Oliviera. Badania przeprowadzono poprzez sekwencjonowanie uzyskanych amplikonów. Zaobserwowano zmiany w mikrobiocie osób chorych na fenyloketonurię z osobami z grupy kontrolnej. Materiałem badanym było bakteryjne rDNA pochodzące z kału osób z grupy kontrolnej jak i od osób z PKU. Największą populację bakterii zasiedlających przewód pokarmowy osoby chorej z PKU zajmują *Bacteroidetes*, 85% całej populacji bakteryjnej i *Firmicutes*, które stanowią tylko 13% całej populacji bakteryjnej. Natomiast osoby zdrowe zawierają najwięcej bakterii z rodziny *Bacteroidetes* zajmują zaledwie 56% i *Firmicutes*, które stanowią 42% całej populacji bakteryjnej. W grupie kontrolnej można zauważyć, że bakterie z rodziny *Verrucomicrobia* nie znajdują się w grupie kontrolnej w przeciwieństwie do grupy z PKU [29].





Rysunek 5. Wyniki sekwencjonowania NGS mikrobiomu osoby chorej z PKU [30]



Rysunek 6. Wyniki sekwencjonowania NGS mikrobiomu osoby z grupy kontrolnej wolnej od PKU [29]

5. Podsumowanie

Wprowadzenie metod sekwencjonowania do analizy mikrobiomu człowieka wniosło wiele dogodnych zmian, które zwiększyły możliwość odczytu materiału genetycznego zawartego w bakteriach. Zastosowanie sekwencjonowania pozwoliło na uzyskanie bardziej wiarygodnych źródeł informacji genetycznej z bakterii. Metody przesiewowe takie jak MLPA [14, 17] czy PCR-DGGE [18] wspomogły naukowców w sekwencjonowaniu pozwalając wyselekcjonować odpowiednie próbki. Pozyskane wyniki z analiz można wykorzystać do rozszerzania wiedzy na temat koegzystencji bakterii w przewodzie pokarmowym ludzi w sposób ogólnodostępny.

Pojawienie się sekwencjonowanej generacji pozwoliła na uzyskanie bardziej wiarygodnych źródeł pozyskania informacji z materiału genetycznego bakterii przewodu pokarmowego. Technika NGS znacząco wpłynęła na rozprzestrzenianie się wiedzy na temat bakterii i nie tylko. Dzięki tej metodzie w połączeniu z wieloma innymi technikami, które mogą posłużyć jako techniki przesiewowe przed docelowym użyciem NGS, osiąga się dobrej jakości wyniki. Technika NGS umożliwia analizę wielu ampikonów, dzięki którym naukowcy mogą śledzić na bieżąco zmiany w zawartości mikroflory jelitowej lub mikroflory zawartej w ślinie [19, 20, 22].

Połączenie techniki NGS z powielaniem fragmentu 16s rRNA ułatwia w znaczącym stopniu analizy metagenomiczne i w prosty sposób, za pomocą platform bioinformatycznych ich szybką analizę oraz uzyskanie zadowalających wyników. W tym przypadku wybór regionu znacząco wpływa na pozyskane wyniki i ułatwia także obróbkę danych metagenomicznych. Metoda 16s rRNA ma wielu zwolenników w zastosowaniu naukowym jak od niedawna medycznym w diagnostyce chorób bakteryjnych [19].

Poniższy artykuł ma charakter przeglądowy, który wprowadza czytelnika w możliwość pozyskania informacji na temat kombinacji technik badania mikrobiomu ludzkiego w celu pozyskania jak najbardziej wiarygodnych wyników.

Literatura

1. Blau N., Shen N., Carducci C., *Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: State of the art, Expert Review of Molecular Diagnostics*, ExpertReviews Ltd., 14(6), 2014, s. 655-671.
2. Tobias E.S., Connor M., Ferguson-Smith M., *Populacyjne badania przesiewowe. Genetykamedyczna*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2013.
3. Polak E., Ficek A., Radvanszky J., Soltysova A., Urge O., Cmelova E., Kantarska D., Kadsı L., *Phenylalanine hydroxylase deficiency in the Slovak population: Genotype-phenotype correlations and genotype-based predictions of BH4-responsiveness*, *Gene*, 526(2), 2013, s. 347-355.
4. Jarołowicz S., Mazur A., *Fenylketonuria – choroba metaboliczna uwarunkowana genetycznie*, Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego, Wydawnictwo UR, Rzeszów 2007, ISBN 1730-3524.
5. Zurflüh M.R., Zschocke J., Linder M., Feillet F., Chery C., Burina A., Stevens R.C., Thöny B., Blau N., *Molecular genetics of tetrahydrobiopterin- responsive phenylalanine hydroxylase deficiency*, *Human Mutation*, 29(1), 2008, s. 167-175.
6. Li N., Jia H., Liu Z., Tao J., Chen S., Li X., Deng Y., Jin X., Song J., Zhang L., Liang Y., Wang W., Zhu J., *Molecular characterisation of phenylketonuria in a Chinese mainland population using next-generation sequencing*, *Scientific Reports*, 5.
7. Wieland A., Frank D.N., Harnke B., Bambha K., *Systematic review: microbial dysbiosis and nonalcoholic fatty liver disease*, *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 42(9), 2015, s. 1051-1063.
8. Ursell L.K., Metcalf J.L., Parfrey L.W., Knight R., *Defining the human microbiome*, *Nutrition Reviews*, 2012, 70(SUPPL.1).
9. Zhang Y., Wang X., Li H., Ni C., Du Z., Yan F., *Human oral microbiota and its modulation for oral health*, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Elsevier Masson SAS, 2018, 99, s. 883-893.
10. Heintz-Bauarschart A., Wilmes P., *Human Gut Microbiome: FunctionMatters*, *Trends in Microbiology*, Elsevier Ltd., 2018, 26(7), s. 563-574.
11. Woese C.R., *Bacterial evolution*, *Microbiology Review*, 51(2), 1987, s. 221-271 .
12. Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N., Alland D., *A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria*, *Journal of MicrobiolMethods*, 69, 2007, s. 330-339.

13. Verma D., Garg P.K., Duney A.K., *Insights into the human oral microbiome*, In Archives of Microbiology, Springer Verlag, 200(4), 2018, s. 525-540.
14. Mancilla V.J., Mann A.E., Zhan Y., Allen M.S., *The adult phenylketonuria (PKU) gut microbiom*, Microorganisms, 9(3), 2021, s. 530.
15. Bassanini G., Ceccarani C., Borgo F., Severgnini M., Rovelli V., Morace G., Verduci E., Borghi E., *Phenylketonuria diet promotes shifts in firmicutes populations*, Frontiers in cellular and infection microbiology, 9, 2019, s. 101.
16. Teng F., Darveekaran N.S.S., Zhu P., Li S., Huang S., Li X., Xu J., Yang F., *Impact of DNA extraction method and targeted 16S-rRNA hypervariable region on oral microbiota profiling*, Scientific Reports, 8(1), 2018.
17. Terefework Z., Pham C.L., Prosperi A.C., Entius M.M., Errami A., van Spanning R.J., Zaura E., Cate J.M., Crielaard W., *MLPA diagnostics of complex microbial communities: relative quantification of bacterial species in oral biofilms*, Journal of microbiological methods, 75(3), 2008, s. 558-565.
18. Verduci E., Moretti F., Bassanini G., Banderali G., Rovelli V., Casiraghi M.C., Morace G., Borgo E., Borghi E., *Phenylketonuric diet negatively impacts on butyrate production*, Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 28(4), 2018, s. 385-392.
19. Boers S.A., Jansen R., Hays J.P., *Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory*, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 38(6), 2019, s. 1059-1070.
20. Kozich J.J., Westcott S.L., Baxter N.T., Highlander S.K., Schloss P.D., *Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform*, Appl Environ Microbiol, 79, 2013, s. 5112-5120.
21. Woese C.R., Fox G.E., *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms*, Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography USA, 74, 1977, s. 5088-5090.
22. Van de Peer Y., Chapelle S., De Wachter R., *A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 24, 1996, s. 3381-3391.
23. Cole J.R., Chai B., Farris R.J., Wang Q., Kulam S.A., McGarrell D.M., Garrity G.M., Tiedje J.M., *The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis*, Nucleic acids research, 33(suppl_1), 2005, s. D294-D296.
24. DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., Rojas M., Brodie E.L., Keller K., Huber T., Daleri D., Hu P., Andersen G.L., *Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB*, Applied and environmental microbiology, 72(7), 2006, s. 5069-5072.
25. Federhen S., *The NCBI taxonomy database*, Nucleic acids research, 40(D1), 2012, s. 136-143.
26. Edgar R.C., *Accuracy of taxonomy prediction for 16S rRNA and fungal ITS sequences*, PeerJ, 6, 2018, s. 46-52.
27. Konstantinidis K.T., Tiedje J.M., *Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead*, Current opinion in microbiology, 10(5), 2007, s. 504-509.
28. Lif Holgersson P., Esberg A., Sjödin A., West C.E., Johansson I., *A longitudinal study of the development of the saliva microbiome in infants 2 days to 5 years compared to the microbiome in adolescents*, Scientific Reports, 10(1), 2020, s. 1-14.
29. Pinheiro de Oliveira F., Mendes R.H., Dobbler P.T., Mai V., Pylro V.S., Waugh S.G., Vairo F., Refosco L.F., Roesch L.F.W., Schwartz I.V.D., *Phenylketonuria and gut microbiota: a controlled study based on next-generation sequencing*, PLoS One, 11(6), 2016, e0157513.

Techniki stosowane do analizy mikrobiomu osób z fenylketonurią

Streszczenie

Badania nad bakteriami bytującymi w danej niszyorganizmu pozwalają na uzyskanie wartościowych informacji m.in. o trybie życia danego organizmu, przebytych chorobach, które mogą znacząco wpływać na zmiany w mikrobiomie człowieka. Choroby genetyczne, a szczególnie będące wrodzonymi wadami metabolizmu mają wpływ na zawartość mikrobiomu w zależności od miejsca występowania konkretnego gatunku, rodziny czy rodzaju bakterii. Fenylketonuria (PKU) jest chorobą metaboliczną związaną m.in. z defektem w genie hydroksylazy fenylalaniny (*PAH*), który koduje enzym odpowiedzialny za przemianę fenylalaniny do tyrozyny. Gen ten znajduje się na ramieniu długim chromosomu 12. naprzędku 24. Choroba ta jest dziedziczona w sposób autosomalny recesywny. Podłoże molekularne nie jest do końca poznane ze względu na licznie występujące mutacje w genie *PAH*. Współczesna biotechnologia oraz bioinżynieria dostarczają nowych, bardziej zaawansowanych narzędzi do sekwencjonowania materiału genetycznego: DNA czy RNA, z próbek pochodzących, np.: ze śliny, kału, krwi czy blozków parafinowych. Wiele takich metod opiera się na podstawowych elementach biologii molekularnej, które zostały ostatecznie przekształcone w bardziej zaawansowane pod względem technologicznym, jak i informatycznym. W zależności od pochodzenia próbki, np. czy to jest próbka śliny, kału lub wymazu z innej części przewodu pokarmowego ludzi, obszary te zasiedlają różne gatunki bakterii. Spowodowane jest to procesami jakie zachodzą w przewodzie pokarmowym człowieka, a także dostępnością składników odżywczych niezbędnych do bytowania dla bakterii środowiskowych, np. liczną rodziną zasiedlającą jelito osób z fenylketonurią są bakterie *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actionobacteriaw* porównaniu z grupą kontrolną (bez fenylketonurii).

Niniejsza praca przedstawia wykorzystanie molekularnych metod identyfikacji materiału genetycznego gatunków bakterii znajdujących się w przewodzie pokarmowym osób, które chorują na fenylketonurię.

Słowa kluczowe: fenylketonuria, hydroksylaza fenylalaniny, mikrobiom, techniki analizy

Techniques used to analyse the microbiome of people with phenylketonuria

Abstract

The study of bacteria living in a particular niche of the organism provides valuable information about the lifestyle of the organism, past illnesses can significantly affect changes in the human microbiome. Genetic diseases, and especially those that are in born defects of metabolism, affect the content of the microbiome depending on the location of a particular species, family, or type of bacteria. Phenylketonuria (PKU) is a metabolic disease associated among others with a defect in the phenylalanine hydroxylase (*PAH*) gene, which encodes the enzyme responsible for the conversion of phenylalanine to tyrosine. This gene is located on the long arm of chromosome 12 of strand 24. The disease is inherited in an autosomal recessive manner. The molecular basis is not fully understood due to numerous mutations in the *PAH* gene. Modern biotechnology and bioengineering are providing new, more advanced tools to sequence genetic material: DNA or RNA, from samples such as saliva, feces, blood, or paraffin blocks. Many such methods are based on basic elements of molecular biology, which were eventually transformed into more advanced ones in terms of technology and information technology. Depending on the origin of the sample, e.g. whether it is a saliva, feces sample, or a swab from another part of the human gastrointestinal tract, different bacterial species inhabit these areas. This is due to the processes that occur in the human digestive tract, as well as the availability of nutrients necessary for the existence of environmental bacteria, e.g. an abundant family colonising the intestine of people with phenylketonuria are *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actionobacteria* compared to the control group (without phenylketonuria).

This paper presents the use of molecular methods to identify the genetic material of bacterial species found in the gastrointestinal tract of people who suffer from phenylketonuria.

Keywords: phenylketonuria, phenylalanine hydroxylase, microbiome, analysis techniques

Cukrzyca MODY: heterogenność genetyczna, metaboliczna i kliniczna

1. Wprowadzenie – cukrzyca typu MODY – definicja, klasyfikacja, obraz kliniczny

Cukrzyca MODY (akronim od ang. *Maturity Onset Diabetes of the Young*) [Online Mendelian Inheritance in Men database OMIM # 606391] to rzadka, monogenowa i nieautoimmunologiczna postać cukrzycy. Szacuje się, że występuje u 2% pacjentów z cukrzycą. Ta heterogenna grupa zaburzeń endokrynologicznych jest dziedziczona autosomalnie dominująco. Manifestuje się zwykle przed 25. rokiem życia. Wyróżniono 14 podtypów MODY. Najczęściej występujące podtypy przypisuje się mutacjom w genach kodujących glukokinazę (GCK) i czynniki jądrowe hepatocytów (ang. *hepatocyte nuclear factor*, HNF). Obraz kliniczny MODY jest podobny do cukrzycy typu 1 i 2, dlatego pacjenci są często błędnie diagnozowani [1]. Cechami, odróżniającymi MODY od cukrzycy typu I (ang. *diabetes mellitus 1*, DM1), są: brak autooprzeciwciał przeciw wyspom trzustkowym, endogenna produkcja insuliny 3-5 lat po pojawieniu się cukrzycy, mierzalny peptyd C w obecności hiperglikemii, niskie zapotrzebowanie na insulinę w trakcie leczenia, brak kwasicy ketonowej w sytuacji pominięcia insuliny [2]. Natomiast cechy przemawiające za MODY, a nietypowe dla DM2, to: początek cukrzycy przed 45. rokiem życia, brak znacznej otyłości, brak rogowacenia ciemnego, prawidłowy poziom trójglicerydów i/lub prawidłowy lub podwyższony poziom lipoprotein o wysokiej gęstości (ang. *high density lipoproteins*, HDL). Ponadto MODY charakteryzuje się łagodną, stabilną hiperglikemią na czczo, która nie postępuje lub nie reaguje znacząco na leczenie farmakologiczne i ekstremalną wrażliwością na pochodne sulfonylmocznika. Niektóre podtypy MODY mogą wiązać się z chorobami nerek, jelita, a nawet wątroby [3].

2. Zróżnicowanie genetyczne, metaboliczne i kliniczne

Zidentyfikowano łącznie 14 podtypów MODY, z których 1-6 zaliczane są do podtypów głównych. Większość genów, których mutacje są związane z MODY, koduje czynniki transkrypcyjne ulegające ekspresji w komórkach β trzustki. Wyjątek stanowi gen *GCK*, którego mutacje charakterystyczne są dla MODY 6. Określenie podtypu MODY jest ważne ze względu na związek podtypu z wiekiem wystąpienia choroby, przebiegiem klinicznym, progresją, rodzajem hiperglikemii i odpowiedzią na leczenie [4]. Większość pacjentów z MODY wykazuje kliniczne cechy izolowanej postaci cukrzycy lub łagodnej hiperglikemii na czczo. Jednak niektóre podtypy MODY są związane z dodatkowymi objawami, takimi jak nieprawidłowości nerek (MODY5) lub zewnątrzwydzielnicza dysfunkcja trzustki (MODY8) [5]. W niniejszym przeglądzie opisano

¹ e.medrek@student.uksw.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe „Immunis”, Wydział Medyczny. Collegium Medicum, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie, <https://wmcm.uksw.edu.pl/>.

głównie różnicowanie kliniczne, metaboliczne, genetyczne sześciu głównych podtypów cukrzycy typu MODY.

MODY 2 [OMIM # 125851] jest postacią związaną z mutacją genu dla glukokinazy (*GCK*), która katalizuje konwersję glukozy do glukozy-6-fosforanu, a tym samym kontroluje wydzielanie insuliny w odpowiedzi na obecność glukozy. W >1000 przypadkach zidentyfikowano ponad 600 mutacji w *GCK*, a zmiany te były dodatnio skorelowane zarówno z objawami hiperglikemii, jak i hipoglikemii [6]. Zasadniczo mutacje te podnoszą próg glukozy dla wydzielania insuliny, przyczyniając się do wzrostu poziomu glukozy w osoczu na czczo (5,5-8,0 mmol/l). Tacy pacjenci wykazują niewielki wzrost stężenia cukru w osoczu po 2 godzinach podczas doustnego badania tolerancji glukozy (OGTT; wzrost o 4,5 mmol/l = 90. percentyl) [7].

MODY 3 [OMIM # 600496] jest postacią związaną z mutacją genu *HNF1A* (ang. *hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A*), który koduje czynnik transkrypcyjny, ulegający ekspresji w wątrobie, nerkach, jelitach i komórkach β trzustki. Najczęstszą mutacją jest *P291fsC* w eksonie 4. Heterozygotyczne mutacje w *HNF1A* powodują postępujący niedobór insuliny, który objawia się łagodną hiperglikemią w dzieciństwie i cukrzycą we wczesnej dorosłości [8]. U pacjentów z MODY 3 ryzyko powikłań mikronaczyniowych i makronaczyniowych jest podobne do obserwowanego u pacjentów z cukrzycą typu 1 i 2. Co ciekawe, u nosicieli mutacji *HNF1A* przed zachorowaniem na cukrzycę rozwija się glikozuria poposiłkowa, co prawdopodobnie jest związane z dysfunkcją kanalików nerkowych [9].

MODY 1 [OMIM # 125850] jest postacią związaną z mutacją genu *HNF4A* (ang. *Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha*), który koduje czynnik transkrypcyjny, regulujący ekspresję genów niezbędnych do transportu i metabolizmu glukozy. Mutacje w *HNF4A* są stosunkowo rzadkie i stanowią około 5% wszystkich przypadków MODY [10]. Fenotypowo MODY1 objawia się postępującym niedoborem insuliny, podobnym do obserwowanego w MODY3. Ponadto gen *HNF4A* jest związany z metabolizmem triglicerydów, a nosiciele mutacji mogą wykazywać obniżony poziom apolipoprotein (apoAII, apoCIII i apoB) [10]. Heterozygotyczność płodowego *HNF4A* prowadzi do makrosomii z powodu hiperinsulinemii w macicy, a następnie przemijającej lub trwałej hipoglikemii u noworodka. Hiperinsulinizm związany z MODY1 na ogół ustępuje w okresie niemowlęcym, po czym następuje stopniowy spadek endogennej produkcji insuliny i progresja cukrzycy w okresie dojrzewania [10].

MODY 5 jest podtypem, spowodowanym mutacją genu *HNF1B* (ang. *HNF1 Homeobox B*), który koduje czynnik transkrypcyjny, biorący udział w organogenezie nerek, dróg moczowo-płciowych, wątroby, płuc, jelit i trzustki [11]. W związku z tym u większości nosicieli mutacji *HNF1B* występują wady rozwojowe nerek, takie jak torbiele nerek, dysplazja nerek, wady dróg moczowych i hipoplastyczna kłębuszkowa choroba nerek [12]. Częstym zjawiskiem jest także cukrzyca, która rozwija się w okresie dojrzewania lub wczesnej dorosłości i zwykle prowadzi do insulinooporności z powodu hipoplazji trzustki. Ponadto pacjenci z MODY 5 wykazują dyslipidemię, w tym niskie stężenie lipoprotein o dużej gęstości i podwyższony poziom triglicerydów [5].

MODY 4 [OMIM # 606392] to bardzo rzadki podtyp cukrzycy, związany z mutacją czynnika transkrypcyjnego *PDX1* (ang. *pancreatic and duodenal homeobox*), kodującego homeodomenę, który wpływa na rozwój zewnątrzwydzielniczych i wewnątrzwydzielniczych przewodów trzustkowych. Mutacje homozygotyczne w *PDX1* powodują

agenezję i hipoplazję trzustki oraz trwałą cukrzycę noworodków [13]. Z kolei mutacje heterozygotyczne prowadzą do upośledzenia funkcji komórek β trzustki i hiperglikemii, w tym do trwałej cukrzycy noworodkowej [5].

MODY 6 [OMIM # 606394] jest podtypem, związanym z mutacją genu *NEUROD1* (ang. *neuronal differentiation 1*), zaangażowanego w rozwój trzustki i neuronów. Odgrywa kluczową rolę w dojrzewaniu i funkcjonowaniu komórek beta trzustki. Wysepki Langerhansa pozbawione *NEUROD1* słabo reagują na glukozę i wykazują profil metaboliczny zbliżony do niedojrzałych komórek β . Heterozygotyczne mutacje w *NEUROD1* wywołują cukrzycę o wczesnym początku, podczas gdy mutacje homozygotyczne mogą powodować cukrzycę noworodków, nieprawidłowości neurologiczne i trudności w uczeniu się [13, 14].

3. Diagnostyka

Bardzo istotne jest prawidłowe zdiagnozowanie MODY. W diagnostyce tej choroby wykonywanymi badaniami laboratoryjnymi są: stężenie glukozy w surowicy na czczo, które w MODY mieści się w przedziale 99-144 mg/dl (5,49-7,99 mmol/l) oraz poziom hemoglobiny glikowanej A1c w surowicy, który typowo ma zakres 5,6-7,3% (38-56 mmol/mol) w wieku ≤ 40 lat i 5,9-7,6% (41-60 mmol/mol) w wieku > 40 lat. Również przydatna jest ocena poziomu białka C-reaktywnego o wysokiej czułości (ang. *high-sensitive CRP*, hsCRP), ponieważ wartości te są niższe w HNF1A- MODY ($< 0,75$ mg/L) niż w innych postaciach cukrzycy. Podstawą diagnozy są badania genetyczne. Pacjenci kwalifikowani do badań genetycznych obejmują nieotyłe osoby z hiperglikemią, brakiem dowodów na autoimmunizację β -komórkową, z zachowaną funkcją komórek β i pacjentów z historią rodzinną podobnego typu cukrzycy wśród krewnych pierwszego stopnia. Mutacje genów, przypisanych konkretnym podtypom MODY, wykrywa się w testach ukierunkowanych na geny (seryjny pojedynczy gen lub panel wielogenowy) albo w kompleksowych testach genomowych (analiza mikromacierzy chromosomalnych lub sekwencjonowanie egzomu), w zależności od fenotypu. Ukierunkowane badania genetyczne wykonuje się zależnie od obrazu klinicznego pacjenta. Na jego podstawie do badań są wybierane określone geny. Zatem technika ta jest właściwa, jeśli pacjent prezentuje objawy charakterystyczne dla pewnych podtypów MODY. Testy genetyczne przeprowadza się seryjnie. Na początku dokonuje się analizy sekwencji prawdopodobnych genów. U pacjentów z klasycznymi objawami MODY w pierwszej kolejności bada się *HNF1A* i kolejno *HNF4A* oraz *GCK*. Jeśli jednak glukoza na czczo wynosi od 5,5 do 8,5 mmol/l, to należy najpierw przetestować *GCK*, i dopiero w następnej kolejności *HNF1A* oraz *HNF4A*. W sytuacji, gdy pacjent ma zaburzenia czynności nerek i trzustki oraz występują u niego zaburzenia ze strony układu moczowo-płciowego, należy rozpocząć od badania *HNF1B*. Jeśli nie zostanie wykryty polimorfizm pojedynczego nukleotydu, należy dokonać analizy delecji i duplikacji celem wykrycia mutacji takich genów, jak *CEL*, *GCK*, *HNF1A*, *HNF1B* i *HNF4A*. Ta metoda diagnostyczna jest czasochłonna i kosztowna. Alternatywą są panele wielogenowe, które składają się z 14 znanych genów MODY i innych wybranych genów. Ta metoda celuje w kilka genów naraz i wyklucza testowanie niepotrzebnych wariantów, dlatego jest bardziej opłacalna. W sytuacji, gdy pacjent nie prezentuje wyraźnych cech klinicznych, stosuje się sekwencjonowanie całego egzomu o wysokiej przepustowości. Ta metoda nie wymaga od klinicysty określenia, który gen jest prawdopodobnie przyczyną wystąpienia



MODY. Sekwencjonowanie całego egzomu daje pełny obraz występujących mutacji, co niewątpliwie jest zaletą w stosunku do testów ukierunkowanych na geny. Sekwencjonowanie całego egzomu jest stosunkowo nowe i niesie ze sobą duży potencjał. Koszt testów genetycznych w kierunku MODY może być sporym obciążeniem dla osób fizycznych. Jednak wykrycie MODY i określenie jej podtypu jest bardzo ważne w aspekcie planowania leczenia i poprawy jakości życia. Testowanie genów MODY w rodzinie obciążonej chorobą może pomóc w wykryciu wariantów MODY u predysponowanych członków i wdrożeniu leczenia odpowiednio szybko, zanim dojdzie do nieodwracalnych skutków i rozwinięcia cukrzycy. Ponadto dokładne badania genetyczne wskazują na możliwość występowania konkretnych powikłań i w ten sposób umożliwiają zmniejszenie wydatków na leczenie. Na przykład MODY związana z mutacjami *HNF1A* i *HNF4A* charakteryzuje się powikłaniami mikronaczyniowymi, które można leczyć za pomocą niskiej dawki pochodnych sulfonilomocznika, zamiast stosowania rygorystycznej insulinoaterapii. Z kolei MODY spowodowana mutacją *GCK* wykazuje mniej powikłań mikronaczyniowych i może nie wymagać żadnego leczenia [3, 15]. Badania genetyczne są kluczowe w diagnostyce MODY, pozwalają na ustalenie jej podtypu oraz zaplanowanie leczenia.

4. Leczenie

W leczeniu cukrzycy MODY należy uwzględnić zróżnicowaną etiologię tej choroby oraz różne rodzaje mutacji genetycznych [16]. Istnieje wiele leków mających zastosowanie w procesie leczenia, spośród których najpopularniejsze to pochodne sulfonilomocznika, meglitynidy oraz insulina [2].

Cukrzycę MODY 1 leczy się przeważnie dietą niskowęglowodanową lub małymi dawkami sulfonilomocznika. Insulinoaterapia jest wykorzystywana w leczeniu zaawansowanej postaci choroby lub w ciąży. Możliwa jest też terapia agonistami glukagonopodobnego peptydu-1 (ang. *glucagon-like peptide 1*, GLP-1) [3]. Cukrzyca MODY 2 zazwyczaj ma dobre rokowanie i nie wymaga leczenia. Dopuszcza się stosowanie insuliny w trakcie ciąży. Cukrzycę MODY 3 leczy się pochodnymi sulfonilomocznika (dodatkowo mogą być stosowane meglitynidy, agoniści GLP-1, inhibitory kotransportera sodowo-glukozowego typu 2 (ang. *sodium/glucose cotransporter 2*, SGLT-2) oraz insulina) [17]. W terapii MODY 4 stosuje się leki hipoglikemizujące oraz insulinę. Cukrzycę MODY 5 leczy się głównie pochodnymi sulfonilomocznika lub repaglinidem oraz insuliną. Ważne, aby leczenie insuliną rozpocząć możliwie jak najwcześniej [3]. W typie MODY 6 podaje się doustne leki hipoglikemizujące, insulinę oraz stosuje się dietę. MODY 7 i 8 leczy się głównie doustnymi lekami hipoglikemizującymi oraz insuliną. W leczeniu MODY 9 stosuje się dietę, doustne leki hipoglikemizujące oraz insulinę [3, 18]. MODY 10 leczy się głównie dietą oraz insuliną [1]. W leczeniu MODY 11 stosuje się dietę, doustne leki hipoglikemizujące i insulinę. Leczeniem z wyboru cukrzycy MODY 12 i 13 są pochodne sulfonilomocznika. MODY 14 jest leczona głównie dietą, doustnymi lekami hipoglikemizującymi oraz insuliną [3,18].

Podsumowując, szerokie wykorzystanie ma insulina, którą stosuje się w typie MODY 1, MODY 3, MODY 4, MODY 5, MODY 6, MODY 7, MODY 8, MODY 9, MODY 10, MODY 11 oraz MODY 14. Modyfikacje diety są wykorzystywane głównie w terapii cukrzycy typu MODY 1, MODY 9, MODY 10, MODY 11, MODY 14. Doustne leki hipoglikemizujące znajdują zastosowanie w takich typach cukrzycy MODY



jak: MODY 1, MODY 3 (w połączeniu z meglitynidami, agonistami GLP-1 oraz inhibitorami SGLT-2), MODY 4, MODY 5 (preferowana jest pochodna sulfonylomocznika lub repaglinid), MODY 6, MODY 7, MODY 8, MODY 9, MODY 11 oraz MODY 12, MODY 13 (w typie 12 i 13 preferowane są pochodne sulfonylomocznika) oraz MODY 14 [1, 6].

5. Podsumowanie

Cukrzyca MODY to rzadka choroba genetyczna; do tej pory wyróżniono 14 jej podtypów. Obraz kliniczny tej choroby jest zbliżony do cukrzycy typu 1 i 2. Jednak istnieje wiele cech odróżniających cukrzycę typu MODY od pozostałych jej typów. Należą do nich między innymi: brak kwasicy ketonowej, brak autooprzeciwciał przeciwko wyspom trzustkowym, możliwość wytwarzania endogennej insuliny, brak znacznej otyłości oraz wiele innych. Zróżnicowanie genetyczne poszczególnych podtypów cukrzycy MODY prowadzi do powstania różnych fenotypów metabolicznych choroby, co jest istotne w dobraniu odpowiedniego postępowania klinicznego. Podtypy MODY 1-6 to podtypy główne. Bardzo istotne jest odpowiednie zdiagnozowanie cukrzycy MODY. W tym celu można posłużyć się badaniami takimi jak: ocena stężenia glukozy w surowicy na czczo, ocena poziomu hemoglobiny glikowanej HbA1c w surowicy, test hsCRP oraz badaniami genetycznymi, które stanowią podstawę diagnostyki poszczególnych podtypów choroby. W leczeniu należy uwzględnić zróżnicowaną etiologię choroby. W terapii szerokie zastosowanie mają: dieta niskowęglowodanowa oraz leki takie jak pochodne sulfonylomocznika, meglitynidy oraz insulina.

Podziękowanie

Praca powstała dzięki dofinansowaniu ze środków Wydziału Medycznego. Collegium Medicum Uniwersytetu Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie.

Literatura

1. Skoczek D., Dulak J., Kaczamakowa-Trojanowska N., *Maturity Onset Diabetes of the Young – New Approaches for Disease Modelling*, International journal of molecular sciences, 22(14), 2021, s. 7553, <https://doi.org/10.3390/ijms22147553>.
2. Urakami T., *Maturity-onset diabetes of the young (MODY): current perspectives on diagnosis and treatment*, Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy, 12, 2019, s. 1047-1056, <https://doi.org/10.2147/DMSO.S179793>.
3. Naylor R., Knight Johnson A., del Gaudio D., *Maturity-Onset Diabetes of the Young Overview*, [w:] Adam M.P. et. al. (red.), *GeneReviews®*, University of Washington, Seattle 2018, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500456/>.
4. Hattersley A.T., Greeley S., Polak M., Rubio-Cabezas O., Njølstad P.R., Młynarski W., Castano L., Carlsson A., Raile K., Chi D.V., Ellard S., Craig M.E., *ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents*, Pediatric diabetes, 19 Suppl 27, 2018, s. 47-63, <https://doi.org/10.1111/pedi.12772>.
5. Kleinberger J.W., Pollin T.I., *Undiagnosed MODY: Time for Action*, Current diabetes reports, 15(12), 2015, s. 110, <https://doi.org/10.1007/s11892-015-0681-7>.
6. Osbak K., Colclough K., Saint-Martin C., *Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia*, Human mutation, 30(11), 2009, s. 1512-1526, <https://doi.org/10.1002/humu.21110>.



7. Stride A., Vaxillaire M., Tuomi T., *The genetic abnormality in the beta cell determines the response to an oral glucose load*, *Diabetologia*, 45(3), 2002, s. 427-435, <https://doi.org/10.1007/s00125-001-0770-9>.
8. Frayling T.M., Bulamn M.P., Ellard S., *Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K.*, *Diabetes*, 46(4), 1997, s. 720-725, <https://doi.org/10.2337/diab.46.4.720>.
9. Steele A.M., Shields B.M., Shepherd M., Ellard S., Hattersley A.T., Pearson E.R., *Increased all-cause and cardiovascular mortality in monogenic diabetes as a result of mutations in the HNF1A gene*, *Diabetic Medicine: a journal of the British Diabetic Association*, 27(2), 2010, s. 157-161, <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2009.02913.x>.
10. Lehto M., Bitzen P.O., Isoma B., *Mutations in the HNF-4alpha gene affects insulin secretion and triglyceride metabolism*, *Diabetes*, 48(2), 1999, s. 423-425, <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.2.423>.
11. Barbacci E., Reber M., Ott M.O., Breilart C., Huetz F., Cereghini S., *Variant hepatocyte nuclear factor 1 is required for visceral endoderm specification*, *Development*, 126(21), 1999, s. 4795-4805, <https://doi.org/10.1242/dev.126.21.4795>.
12. Edghill E.L., Bingham C., Ellard S., Hattersley A.T., *Mutations in hepatocyte nuclear factor-1beta and their related phenotypes*, *Journal of medical genetics*, 43(1), 2006, s. 84-90, <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.032854>.
13. Gonsorcikova L., Pruhova S., Cinek O., *Autosomal inheritance of diabetes in two families characterized by obesity and a novel H241Q mutation in NEUROD1*, *Pediatric diabetes*, 9(4 Pt 2), 2008, s. 367-372, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18331410/>.
14. Rubio-Cabezas O., Minton J.A., Kantor I., Williams D., Ellard S., Hattersley A.T., *Homozygous mutations in NEUROD1 are responsible for a novel syndrome of permanent neonatal diabetes and neurological abnormalities*, *Diabetes*, 59(9), 2010, s. 2326-2331, <https://doi.org/10.2337/db10-0011>.
15. Yahaya T.O., Ufuoma S.B., *Genetics and Pathophysiology of Maturity-onset Diabetes of the Young (MODY): A Review of Current Trends*, *Oman Medical Journal*, 35(3), e126, 2020, <https://doi.org/10.5001/omj.2020.44>.
16. Firdous P., Nissar K., Ali S., Ganai B.A., Shabir U., Hassan T., Masoodi S.R., *Genetic Testing of Maturity-Onset Diabetes of the Young Current Status and Future Perspectives*, *Frontiers in endocrinology*, 9, 2018, s. 253, <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00253>.
17. Nkonge K.M., Nkonge D.K., Nkonge T.N., *The epidemiology, molecular pathogenesis, diagnosis, and treatment of maturity-onset diabetes of the young (MODY)*, *Clinical diabetes and endocrinology*, 6(1), 2020, <https://doi.org/10.1186/s40842-020-00112-5>.
18. Delvecchio M., Pastore C., Giordano P., *Treatment Options for MODY Patients: A Systematic Review of Literature*, *Diabetes therapy: research, treatment and education of diabetes and related disorders*, 11(8), 2020, s. 1667-1685, <https://doi.org/10.1007/s13300-020-00864-4>.

Cukrzyca MODY: heterogenność genetyczna, metaboliczna i kliniczna

Streszczenie

Celem pracy jest przedstawienie najnowszych danych dotyczących etiopatogenezy, diagnostyki i leczenia cukrzycy typu MODY (ang. maturity-onset diabetes of the young), co może mieć znaczenie w kontekście lepszego zrozumienia tej rzadkiej choroby.

Cukrzyca typu MODY należy do rzadkich, wrodzonych, monogenowych, najczęściej dziedziczonych autosomalnie dominująco postaci cukrzycy, charakteryzujących się przebiegiem klinicznym zbliżonym do cukrzycy typu 2. Jest uwarunkowana genetycznie, a fenotyp zależy od lokalizacji mutacji genowych. Aktualnie wyróżnia się 14 podtypów MODY, warunkowanych mutacjami różnych genów. Fenotypowo podtypy MODY różnią się wiekiem wystąpienia, przebiegiem klinicznym, rodzajem hiperglikemii i odpowiedzią na leczenie. Najczęściej występują podtypy 2 i 3. Najłagodniejszym i najlepiej poznany podtypem



MODY jest MODY 2, spowodowany mutacją genu *GCK* dla glukokinazy. MODY ujawnia się zazwyczaj w 2–3 dekadzie życia. Badania diagnostyczne obejmują oznaczenie glikemii na czczo bądź test doustnego obciążenia glukozą (OGTT). Istotne jest, aby wśród pacjentów z rozpoznaną w przeszłości cukrzycą typu 1 lub 2 o niejednoznacznym przebiegu, wykonać badania molekularne. Pozwala to na ustalenie prawidłowego rozpoznania i ustalenia podtypu MODY, co ma kluczowe znaczenie dla planowania postępowania klinicznego.

Słowa kluczowe: cukrzyca typu MODY, zróżnicowanie, leczenie, diagnostyka

MODY diabetes: genetic, metabolic and clinical heterogeneity

Abstract

The aim of this study is to present the latest data on etiopathogenesis, diagnosis and treatment of maturity-onset diabetes of the young (MODY), which may be important in the context of a better understanding of this rare disease.

MODY diabetes belongs to rare, congenital, monogenic, mostly autosomal dominantly inherited forms of diabetes, characterized by clinical course similar to type 2 diabetes. It is genetically determined and the phenotype depends on the location of gene mutations. Currently, there are 14 subtypes of MODY, conditioned by mutations of different genes. Phenotypically, MODY subtypes differ in age of onset, clinical course, type of hyperglycaemia and response to treatment. The most common subtypes are 2 and 3. The mildest and best known subtype of MODY is MODY 2, caused by a mutation in the *GCK* gene for glucokinase. MODY usually manifests itself in the 2-3 decade of life. Diagnostic tests include fasting blood glucose or oral glucose tolerance test (OGTT). It is important to perform molecular tests among patients with a history of ambiguous type 1 or type 2 diabetes. This allows to establish the correct diagnosis and to determine the subtype of MODY, which is crucial for planning clinical management.

Keywords: MODY diabetes, differentiation, treatment, diagnosis

Cukrzyca, otyłość i przewlekłe nadciśnienie tętnicze jako czynniki ryzyka stanu przedrzucawkowego w ciąży

1. Cel publikacji

Celem pracy jest omówienie zagadnienia stanu przedrzucawkowego u kobiet w ciąży, ze szczególnym uwzględnieniem czynników ryzyka, w szczególności cukrzycy, otyłości i przewlekłego nadciśnienia tętniczego.

2. Metodyka

Praca ma charakter przeglądu. Przeglądu piśmiennictwa naukowego dokonano z wykorzystaniem bazy danych PubMed NCBI (*National Centre of Biotechnological Information*), Google Scholar i innych. Wyszukiwania publikacji oparto na hasłach takich jak: „preeclampsia”, „diabetes AND preeclampsia”, „obesity AND preeclampsia”, „chronic arterial hypertension AND preeclampsia”.

3. Stan przedrzucawkowy – definicja i epidemiologia

Stan przedrzucawkowy określany także mianem preeklampsji albo zatrucia ciążyowego stanowi zespół objawów chorobowych, które mogą wystąpić u kobiet po 20. tygodniu ciąży. W rzadkich przypadkach może rozwinąć się w trakcie porodu lub porodu. Stan przedrzucawkowy jest niebezpieczny z tego względu, że może zagrażać dobrostanowi i życiu płodu i/lub kobiety ciężarnej. Zatrucie ciążyowe charakteryzuje się podwyższonym ciśnieniem tętniczym krwi (>140/90 mm Hg), któremu zwykle towarzyszy białkomocz, który definiuje się jako utratę >300 mg białka na dobę [1]. W przypadku nieobecności białkomoczu stan przedrzucawkowy można stwierdzić na podstawie objawów dodatkowych, takich jak: bóle głowy, bóle w nadbrzuszu, zaburzenia widzenia, małopłytkowość, wzrost aktywności enzymów wątrobowych, które można oznaczyć w badaniach laboratoryjnych [2]. Preeklampsję charakteryzuje współwystępowanie zwiększonego systemowego oporu naczyniowego, wzmożonej aktywacji płytek krwi, aktywacji układu krzepnięcia oraz zaburzeń czynności śródbłonna. Przyczyną tego stanu są zaburzenia czynności łożyska, co potwierdza szybkie ustępowanie stanu przedrzucawkowego po porodzie. W nerkach dochodzi do zmian czynnościowych i morfologicznych, zmniejsza się przesączanie kłębuszkowe, w skrajnych wypadkach mogą wystąpić objawy uszkodzenia nerek [3]. Stan przedrzucawkowy dotyczy 2-15% wszystkich ciąż i stanowi

¹ paulina.zegarska@student.uksw.edu.pl, Wydział Medyczny. Collegium Medicum, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie, <https://wmcu.uksw.edu.pl/>.

² natalia.a131198@gmail.com, Wydział Medyczny. Collegium Medicum, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie, <https://wmcu.uksw.edu.pl/>.

³ marysia.bendykowska@gmail.com, Wydział Medyczny. Collegium Medicum, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie, <https://wmcu.uksw.edu.pl/>.

⁴ e.mędrək@student.uksw.edu.pl, Wydział Medyczny. Collegium Medicum, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie, <https://wmcu.uksw.edu.pl/>



wiodącą przyczynę zgonu matki w krajach rozwijających się. Statystycznie powoduje ok. 50 000-70 000 przypadków zgonów u ciężarnych w ciągu roku, co wynosi około 14% [4]. W krajach rozwiniętych dzięki odpowiedniej opiece ryzyko zgonu z powodu stanu przedrzucawkowego zostało ograniczone. Stan przedrzucawkowy jest też główną przyczyną jatrogennego porodu przedwczesnego i w dużej mierze przyczynia się do zwiększenia kosztów opieki zdrowotnej związanej z wcześniactwem [5].

4. Patogeneza stanu przedrzucawkowego

Patogeneza stanu przedrzucawkowego obejmuje czynniki genetyczne, matczyne oraz immunologiczne. W prawidłowym łożysku zmiany w tętnicach spiralnych rozciągają się do mięśniówki macicy, podczas gdy w stanie przedrzucawkowym ograniczają się do doczesnej co skutkuje hipoperfuzją macicy i wyższą prędkością przepływu krwi. W wyniku upośledzenia perfuzji łożyskowej wykształca się łożysko o wysokim oporze naczyniowym. W mechanizmie molekularnym w prawidłowym rozwoju łożyska zachodzi proces zwany „pseudo-waskulogenezą” lub „mimikrą naczyniową” – cytotrofoblasty różnicują się z fenotypu nabłonkowego w śródbłonkowy. Jednak w stanie przedrzucawkowym cytotrofoblasty nie naciekają tętniczek spiralnych i jednocześnie nie wykazują ekspresji markerów adhezji śródbłonka, takich jak: VE-kadheryna, integryna $\alpha 1\beta 1$ i $\alpha V\beta 3$, co sugeruje, że mechanizmy przyczyniające się do niedokrwienia łożyska rozpoczynają się na bardzo wczesnym etapie ciąży. U ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym stwierdza się wysoki poziom receptora naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonka typu 1 (sFLT1) oraz wysoki poziom czynnika indukowanego hipoksją 1 (HIF1 α), który wraz z czynnikiem indukowanym hipoksją 2 (HIF2 α) regulują ekspresję genów indukowanych hipoksją, w tym: erytropoetyny, czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) i syntazy tlenu azotu (NO). Stres oksydacyjny odgrywa kluczową rolę w rozwoju łożyska. W stanie przedrzucawkowym występuje zaburzenie stanu równowagi między mechanizmami antyoksydacyjnymi i prooksydacyjnymi co wynika z nieprawidłowej przebudowy tętnic spiralnych łożyska. Na poziomie histologicznym zmiany patologiczne stanu przedrzucawkowego i rzucawkowego charakteryzują się rozległymi zmianami śródbłonka w różnych narządów. Nadmierny poziom antyangiogenego czynnika sFLT1, wytwarzanego w łożysku i uwalnianego do matczynej krążenia, indukuje dysfunkcję śródbłonka matki. Wysoki stosunek sFLT1:PIGF w osoczu są również silnymi predyktorami ciężkości choroby i niekorzystnych wyników klinicznych. Innym ważnym mediatorem dysfunkcji śródbłonka w stanie przedrzucawkowym jest obniżenie produkcji NO, który jest silnym środkiem rozszerzającym naczynia krwionośne i przeciwutleniaczem, a także uczestniczy w działaniu łożyskowego czynnika wzrostu (PIGF) i VEGF in vitro. U kobiet ze stanem przedrzucawkowym wykazano obniżony poziom krążącego siarkowodoru (H₂S), który uczestniczy w szlaku rozszerzania naczyń i angiogenezy oraz wysoki poziom endoteliny 1 (ET1). ET1 jest silnym środkiem zwężającym naczynia krwionośne i stanowi czynnik ryzyka w rozwoju nadciśnienia i uszkodzenia nerek, które pojawiają się w wyniku blokady VEGF [6].

W patogenezie nadciśnienia występującego w stanie przedrzucawkowym nie pośredniczy układ renina-angiotensyna-aldosteron, gdzie w odróżnieniu od fizjologicznego wzrostu ciśnienia w prawidłowej ciąży, wartości te pozostają niskie. W nadciśnieniu tym pośredniczą czynniki antyangiogenne i agonistyczne autoprzeciwciała, które wiążą

się z receptorem angiotensyny II typu 1 rozwijające się u kobiet ze stanem przedzucawkowym [6].

Ponadto stan przedzucawkowy charakteryzuje się brakiem równowagi w profilu limfocytów T, z przewagą limfocytów T pomocniczych 1 i związanych z nimi cytokin, takich jak interferon γ (IFN γ) i czynnik martwicy nowotworów (TNF). Ta dysregulacja prawdopodobnie przyczynia się do rozwoju nieprawidłowego łożyska i wynikającego z tego stanu zapalnego u matki i dysfunkcji śródbłonna. Zaburzenie równowagi czynników angiogennych aktywuje dopełniacz, który doprowadza do rozwoju stanu przedzucawkowego, atypowego zespołu hemolityczno-mocznicowego, mikroangiopatii zakrzepowej (TMA) oraz zespołu HELLP [6].

5. Czynniki ryzyka stanu przedzucawkowego

Wśród czynników wysokiego ryzyka stanu przedzucawkowego wyróżnia się schorzenia matki takie jak przewlekłe nadciśnienie i nadciśnienie występujące w obecnej ciąży, przewlekła choroba nerek i choroby autoimmunologiczne oraz cukrzyca typu 1 i 2. Czynniki średniego ryzyka są między innymi pierwsza ciąża lub sytuacja gdy od ostatniej ciąży minęło co najmniej 10 lat, wiek po 40. roku życia, ciąża wielopłodowa, otyłość oraz występowanie przypadków stanu przedzucawkowego w rodzinie. Dodatkowo takie czynniki jak migrena, bolesne miesiączkowanie, zakażenia, czynniki genetyczne, zaburzenia snu we wczesnej ciąży, a także techniki wspomaganego rozrodu również przyczyniają się do rozwoju stanu przedzucawkowego [7].

5.1. Stan przedzucawkowy u kobiet z cukrzycą typu 1 i 2

Ciąża o prawidłowym przebiegu charakteryzuje się względną opornością na insulinę i hiperinsulinemię, co warunkuje odpowiednie odżywianie rozwijającego się płodu. Zgodnie z tą hipotezą, zaburzenia charakteryzujące się dysfunkcją łożyska mogą prowadzić do hipotrofi płodów oraz niedorozwoju strukturalnego i funkcjonalnego poszczególnych narządów. Wykazano, iż stan przedzucawkowy jest związany ze zwiększoną hiperinsulinemią, nieprawidłową akumulacją glikogenu łożyskowego oraz zaburzeniami ścieżki sygnalizacyjnej insuliny, co może prowadzić do rozwoju insulinooporności, która wydaje się działać synergistycznie z zaburzonymi czynnikami angiogennymi, powodując zwiększenie ryzyka stanu przedzucawkowego [8].

Istniejąca wcześniej cukrzyca jest czynnikiem ryzyka stanu przedzucawkowego. W porównaniu ze stosunkowo niską częstością występowania stanu przedzucawkowego u kobiet bez cukrzycy (2-7%) stan przedzucawkowy rozpoznawany jest w 15-20% ciąż u kobiet z cukrzycą typu 1 i 10-14 % ciąż u kobiet z cukrzycą typu 2 [8]. Otyłość jest wspólnym czynnikiem ryzyka zarówno stanu przedzucawkowego, jak i cukrzycy typu 2, jednak podwyższone ryzyko wystąpienia stanu przedzucawkowego wśród kobiet z cukrzycą typu 2 utrzymuje się także przy optymalnej masie ciała i prawidłowym wskaźniku BMI. W badaniu populacyjnym w stanie Waszyngton wykazano, że istniejąca wcześniej cukrzyca była czynnikiem ryzyka zarówno wczesnego początku (rozpoznanie przed 34 tygodniem ciąży; współczynnik ryzyka (HR): 1,87, 95% przedział ufności (CI): 1,60-2,81), jak i późnego początku (HR: 2,46, 95% CI: 2,32-2,61) stanu przedzucawkowego u ciężarnych [9]. Ponadto wykazano, że czynnikami predysponującymi do wystąpienia stanu przedzucawkowego u kobiet z cukrzycą typu 1 i typu 2 są: zaawansowany wiek matki, przebyty stan przedzucawkowy, nadciśnienie



tętnicze, dłuższy czas trwania cukrzycy, mikroalbuminuria, nefropatia i retinopatia oraz słaba kontrola glikemii [10].

Istotny jest także związek między czynnikami antyangiogennymi (sFlt-1, sEng) i proangiogennymi (PGF) a stanem przedrzucawkowym u ciężarnych z wcześniej stwierdzoną cukrzycą. Największe przeprowadzone badanie obejmujące 540 kobiet z cukrzycą typu 1 dotyczyło czynników angiogennych w osoczu badanych w 26. tygodniu ciąży i wykazało wzrost wartości rozpuszczalnej formy receptora naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna typu 1 (sFlt1) oraz rozpuszczalnej endogliny (sEng) w osoczu oraz niższe wartości łożyskowego czynnika wzrostu (PGF) u ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym (n = 94) w porównaniu z kobietami, u których nie rozwinął się stan przedrzucawkowy. Dodanie sFlt-1:PGF nieznacznie poprawiło wydajność modeli predykcyjnych opartych na tradycyjnych czynnikach ryzyka stanu przedrzucawkowego. Korzystne byłoby przeprowadzenie dodatkowych badań czynników angiogennych w odniesieniu do ryzyka stanu przedrzucawkowego u kobiet z cukrzycą typu 2, ponieważ większość badań koncentruje się na cukrzycy typu 1 [11].

Istotne znaczenie w patogenezie stanu przedrzucawkowego u ciężarnych może mieć także fenotyp haptoglobiny (Hp) oraz stres oksydacyjny [12]. W randomizowanym kontrolowanym badaniu (RTC) wykazano, że przyjmowane antyoksydacyjne witaminy C i E zmniejszyły częstość występowania stanu przedrzucawkowego o 60% wśród ciężarnych z grupy wysokiego ryzyka [13]. Niewielkie badania kliniczno-kontrolne kobiet bez cukrzycy wykazały, że ryzyko stanu przedrzucawkowego było zwiększone, zmniejszone lub bez istotnych różnic u kobiet z silniejszym antyoksydacyjnym fenotypem Hp 1-1 [14]. W badaniach przeprowadzonych przez Weissgerber i wsp. stwierdzono, że fenotyp Hp 2-2 wiązał się z niższym ryzykiem stanu przedrzucawkowego. Autorzy nie znaleźli jednak dowodów na to, że witaminy C i E zapobiegają stanom przedrzucawkowym u kobiet z fenotypem Hp 1-1 i 2-1. Ponadto stwierdzono, że codzienna suplementacja witaminy E eliminuje zwiększone ryzyko chorób sercowo-naczyniowych obserwowane u osób z cukrzycą typu 2 Hp 2-2, ale nie ma wpływu na osoby z cukrzycą Hp 2-1 lub 1-1 [15].

5.2. Stan przedrzucawkowy u kobiet z cukrzycą ciążową

Cukrzycę ciążową (GDM) definiuje się jako hiperglikemię, którą po raz pierwszy rozpoznaje się w czasie ciąży. American Diabetes Association (ADA) zaleca stosowanie tradycyjnego dwuetapowego podejścia lub nowszego jednoetapowego podejścia do badania przesiewowego w kierunku GDM w 24-28 tygodniu ciąży. Częstość występowania GDM waha się od 2-10% wszystkich ciąż w krajach rozwiniętych; oczekuje się jednak, że wskaźniki te drastycznie wzrosną wraz z przyjęciem mniej restrykcyjnych kryteriów diagnostycznych Międzynarodowego Stowarzyszenia Grup Badawczych Diabetologii i Ciąży – IADPSG [16]. GDM może wiązać się z powikłaniami porodowymi, w tym makrosomią i porodem operacyjnym. Długoterminowe zagrożenia dla zdrowia związane z GDM obejmują zwiększone ryzyko cukrzycy typu 2 zarówno dla kobiety, jak i dziecka. GDM i stan przedrzucawkowy mają wiele wspólnych czynników ryzyka, w tym zaawansowany wiek matki, ciążę wielopłodową, pochodzenie etniczne i otyłość przed ciążą [17]. GDM jest często wymieniana jako czynnik ryzyka rozwoju stanu przedrzucawkowego; jednak wcześniejsze badania nad współwystępowaniem tych dwóch patologii były niejednoznaczne i/lub nie uwzględ-



niały wspólnych czynników ryzyka, takich jak otyłość. Retrospektywne badanie 647 392 ciąży w Niemieckim Rejestrze Jakości Perinatalnej zbadało związek między GDM a stanem przedzucawkowym, jednocześnie kontrolując wspólne czynniki ryzyka. Autorzy stwierdzili, że prawdopodobieństwo wystąpienia stanu przedzucawkowego było zwiększone u kobiet z GDM (skorygowany iloraz szans (aOR): 1,29, 95% CI: 1,19-1,41), nawet po uwzględnieniu wieku, narodowości, statusu pracy, palenia tytoniu, liczby porodów, ciąży wielopłodowej, stan sprzed ciąży i przyrostu masy ciała podczas ciąży [17]. Wyniki te są zgodne z innymi badaniami rejestrów urodzeń w Kanadzie i Szwecji, które potwierdzają, że GDM jest niezależnym czynnikiem ryzyka stanu przedzucawkowego [18].

5.3. Otyłość a stan przedzucawkowy

Otyłość kobiety ciężarnej wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia stanu przedzucawkowego, co prawdopodobnie jest związane ze stresem oksydacyjnym, stanem zapalnym i zaburzoną strukturą śródbłonna naczyń. Ostatnie badania naukowe donoszą o rozległym nacieku neutrofilów w naczyniach krwionośnych i stanie zapalnym naczyń zarówno u kobiet ze stanem przedzucawkowym, jak i u kobiet otyłych. Dlatego też, jeśli układ naczyniowy otyłych kobiet jest objęty stanem zapalnym, mogą one mieć zwiększone ryzyko rozwoju stanu przedzucawkowego oraz dodatkowych obciążeń związanych z ciążą [19].

Otyłość matki niekorzystnie wpływa na płód i niesie ze sobą wiele niekorzystnych konsekwencji zdrowotnych. Retrospektywne badania populacyjne ze Szwecji i Londynu wykazały, że ryzyko śmierci płodu po 28. tygodniu u otyłych kobiet jest czterokrotnie wyższe niż u kobiet z prawidłową masą ciała. Dodatkowy problem stanowi także utrudniona diagnostyka radiologiczna, co skutkuje spadkiem wykrywalności patologii, zwłaszcza w obrębie twarzoczaszki, serca, pępowiny i kręgosłupa [19].

5.4. Otyłość a cukrzyca ciążowa

W jednym z badań starano się zidentyfikować najistotniejsze kliniczne czynniki ryzyka stanu przedzucawkowego u kobiet z GDM [20]. Otyłość w pierwszym trymestrze (zdefiniowana jako BMI ≥ 27 kg/m²; aOR: 10,4, 95% CI: 5,3-20,8), rozpoznanie GDM przed 20. tygodniem ciąży (aOR: 8,0, 95% CI: 4,3-14,9) i hipoglikemia (aOR: 8,4; 95% CI: 5,6-15,4) stanowiły najistotniejsze czynniki ryzyka stanu przedzucawkowego [20]. Wśród nich otyłość matki może być najbardziej modyfikowalnym czynnikiem ryzyka, chociaż nowe wyniki badań wskazują również na nadmierny przyrost masy ciała podczas ciąży jako niezależny modyfikowalny czynnik ryzyka stanu przedzucawkowego. W badaniu z udziałem 2037 kobiet z GDM oceniano wpływ stanu masy ciała przed ciążą, przyrostu masy ciała podczas ciąży i kontrolę glikemii w trzecim trymestrze (za pomocą hemoglobiny glikowanej lub HbA1c) na ryzyko nadciśnienia indukowanego ciążą (w tym stan przedzucawkowy i nadciśnienie tętnicze rozwijające się po 20. tygodniu ciąży) [21]. Autorzy stwierdzili, że słaba kontrola glikemii (aOR: 2,5, 95% CI 1,1-5,7) otyłość przed ciążą (aOR: 8,9, 95% CI: 5,0-16,0) oraz nadmierny ciążowy przyrost masy ciała (aOR: 1,9, 95% CI: 1,1-3,4) wiązały się ze zwiększonym ryzykiem nadciśnienia indukowanego ciążą [21]. Częstość nadciśnienia indukowanego ciążą była najwyższa wśród kobiet otyłych, które przybrały na wadze w czasie ciąży (41%). W innym badaniu specyficznym dla stanu

przedrzucawkowego nadmierny przyrost masy ciała podczas ciąży wiązał się z 1,8-krotnym wzrostem prawdopodobieństwa wystąpienia stanu przedrzucawkowego (aOR: 1,4; 95% CI: 0,6-3,1) w porównaniu do prawidłowego przyrostu masy ciała w czasie ciąży [22]. Podsumowując, wyniki te wskazują, że zarówno nadmierny przyrost masy ciała podczas ciąży, jak i istniejąca wcześniej otyłość mogą zwiększać ryzyko wystąpienia stanu przedrzucawkowego u kobiet z GDM.

5.5. Przewlekłe nadciśnienie tętnicze a stan przedrzucawkowy

Przewlekłe nadciśnienie tętnicze w ciąży definiowane jest jako wartości ciśnienia skurczowego równego lub powyżej 140 mmHg i/lub rozkurczowe o wartości równej lub powyżej 90 mmHg. Ryzyko wystąpienia nadciśnienia tętniczego w ciąży wzrasta wraz z wiekiem. Czynnikiem ryzyka jest również otyłość. U wielu kobiet występuje nadciśnienie tętnicze, dlatego ważne jest odpowiednie informowanie pacjentki i omówienie ewentualnych konsekwencji w razie nieplanowanej ciąży. Należy zdiagnozować także pochodzenia nadciśnienia przed zajściem w ciążę oraz wykonać dobową zbiórkę moczu w celu oznaczenia białka, co ma na celu dostarczenie informacji prognostycznych dla przebiegu ciąży. Rozwój stanu przedrzucawkowego to najczęstsze powikłanie przewlekłego nadciśnienia tętniczego u ciężarnych. Występuje u około 3-5% ciężarnych populacji ogólnej, zaś aż u 17-25% kobiet z przewlekłym nadciśnieniem tętniczym, diagnozowany częściej u osób rasy czarnej. Dodatkowo, wystąpienie stanu przedrzucawkowego w poprzedniej ciąży powoduje wzrost ryzyka wystąpienia go po raz kolejny. Rozpoznanie stanu przedrzucawkowego jest problematyczne ze względu na występujące podwyższone ciśnienie krwi i białkomocz, który mógł być obecny nawet przed ciążą, dlatego też istotna jest obserwacja nasilania się tych objawów. Obecność białka w moczu przyczynia się do zahamowania wzrostu płodu. Niektóre nieprawidłowości, takie jak: trombocytopenia, kreatynina w surowicy i próby wątrobowe mogą pomóc w odróżnieniu stanu przedrzucawkowego od wzrostu ciśnienia tętniczego. Stan ten prowadzi do indukcji wczesnego porodu (częste cięcia cesarskie), skutkuje odklejeniem łożyska i zaburzeniami wzrostu płodu. Trwają prace badawcze nad skutecznymi markerami do użytku klinicznego. Prawidłowe rozpoznanie jest niezbędne do wdrożenia odpowiedniego leczenia. U pacjentek z nadciśnieniem tętniczym planujących zajście w ciążę zaleca się dietę DASH (ang. *Dietary Approach to Stop Hypertension*) [23, 24].

6. Wnioski

Stan przedrzucawkowy stanowi zespół objawów chorobowych, które mogą wystąpić u kobiet po 20. tygodniu ciąży, w trakcie porodu lub połogu. Patologia dotyczy 2-15% wszystkich ciąż i stanowi wiodącą przyczynę zgonu matki i płodu. Patogeneza stanu przedrzucawkowego obejmuje czynniki genetyczne, matczyne oraz immunologiczne. W stanie przedrzucawkowym dochodzi do zaburzenia stanu równowagi między mechanizmami antyoksydacyjnymi i prooksydacyjnymi, co prowadzi do dysfunkcji śródbłonna naczyniowego i niewydolności wielonarządowej. Udowodniono, że cukrzyca typu 1 i 2, cukrzyca ciążowa, otyłość i przewlekłe nadciśnienie tętnicze są czynnikami predisponującymi do wystąpienia stanu przedrzucawkowego u ciężarnych.



Literatura

1. Ramos J., Sass N., Costa S., *Preeclampsia. Pré-eclâmpsia*, Revista brasileira de ginecologia e obstetricia: revista da Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia, 39(9), 2017, s. 496-512.
2. Bręborowicz G., *Położnictwo i Ginekologia*, 2010.
3. Tomimatsu T., Mimura K., Matsuzaki S., Endo M., Kumasawa K., Kimura T., *Preeclampsia: Maternal Systemic Vascular Disorder Caused by Generalized Endothelial Dysfunction Due to Placental Antiangiogenic Factors*. International journal of molecular sciences, 20(17), 2019, s. 4246.
4. Hutcheon J.A., Lisonkova S., Joseph K.S., *Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy*, Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology, 25(4), 2011, s. 391-403.
5. Ghulmiyyah L., Sibai B., *Maternal mortality from preeclampsia/eclampsia*. Seminars in perinatology, 36(1), 2012, s. 56-59.
6. Phipps E.A., Thadhani R., Benzing T., Karumanchi S.A., *Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies*, Nature Reviews Nephrology, 15, 2019, s. 275-289.
7. Bacz A., *Stan przedrzucawkowy i rzucawka*, <https://www.mp.pl/pacjent/ciaza/przebiegciazy/75579,stan-przedrzucawkowy-i-rzucawka> [data dostępu 24.04.2022].
8. Groen B., Links T.P., van den Berg P.P., Hellinga M., Moerman S., Visser G.H., *Similar adverse pregnancy outcome in native and nonnative dutch women with pregestational type 2 diabetes: a multicentre retrospective study*. ISRN obstetrics and gynecology, 2013, s. 361-435.
9. Lisonkova S., Joseph K.S., *Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early – versus late-onset disease*, Am J Obstet Gynecol., 209(6), 2013, s. 544.
10. Colatrella A., Loguercio V., Mattei L., Trappolini M., Festa C., Stoppo M., *Hypertension in diabetic pregnancy: impact and long-term outlook*, Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism, 24(4), 2010, s. 635-651.
11. Holmes V.A., Young I.S., Patterson C.C., Maresh M.J., Pearson D.W., Walker J.D., *The role of angiogenic and antiangiogenic factors in the second trimester in the prediction of preeclampsia in pregnant women with type 1 diabetes*. Diabetes Care, 36(11), 2013, s. 3671-79.
12. Maynard S.E., Min J.Y., Merchan J., Lim K.H., Li J., Mondal S., *Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia*, J Clin Invest., 111(5), 2003, s. 649-58.
13. Chappell L.C., Seed P.T., Briley A.L., Kelly F.J., Lee R., Hunt B.J., *Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial*. Lancet., 354(9181), 1999, s.810–860.
14. Weissgerber T.L., Roberts J.M., Jeyabalan A., Powers R.W., Lee M., Datwyler S.A., *Haptoglobin phenotype, angiogenic factors, and preeclampsia risk*. Am J Obstet Gynecol., 206(4), 2012, s. 10–18.
15. Weissgerber T.L., Gandley R.E., McGee P.L., Spong C.Y., Myatt L., Leveno K.J., *Haptoglobin phenotype, preeclampsia risk and the efficacy of vitamin C and E supplementation to prevent preeclampsia in a racially diverse population*, PLoS One, 8(4), 2013, s. 604.
16. Wendland E.M., Torloni M.R., Falavigna M., Trujillo J., Dode M.A., Campos M.A., *Gestational diabetes and pregnancy outcomes – a systematic review of the World Health Organization (WHO) and the International Association of Diabetes in Pregnancy Study Groups (IADPSG) diagnostic criteria*, BMC Pregnancy Childbirth, 12, 2012, s. 23.
17. Schneider S., Freerksen N., Rohrig S., Hoefl B., Maul H., *Gestational diabetes and preeclampsia – similar risk factor profiles?*, Early Hum Dev., 88(3), 2012, s. 179-84.

18. Nerenberg K.A., Johnson J.A., Leung B., Savu A., Ryan E.A., Chik C.L., *Risks of gestational diabetes and preeclampsia over the last decade in a cohort of Alberta women*, J Obstet Gynaecol Can., 35(11), 2013, s. 986-94.
19. Spradley F.T., Palei A.C., Granger J.P., *Increased risk for the development of preeclampsia in obese pregnancies: weighing in on the mechanisms*. American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology, 309(11), 2015, s. 1326-1343.
20. Phaloprakarn C., Tangjitgamol S., *Risk assessment for preeclampsia in women with gestational diabetes mellitus*, J Perinat Med., 37(6), 2009, s. 617-21.
21. Barquiel B., Herranz L., Grande C., Castro-Dufourny I., Llaro M., Parra P., *Body weight, weight gain and hyperglycaemia are associated with hypertensive disorders of pregnancy in women with gestational diabetes*, Diabetes & metabolism, 40(3), 2014, s. 204-10.
22. Harper L.M., Tita A., Biggio J.R., *The Institute of Medicine Guidelines for Gestational Weight Gain after a Diagnosis of Gestational Diabetes and Pregnancy Outcomes*, Am J Perinatol., 2014, s. 122.
23. Seely W.E., Ecker F., *Chronic Hypertension in Pregnancy*, Circulation, 2014, s. 1254-1261.
24. Lecarpentier E., Tsatsaris V., Goffinet F., Cabrol D., Sibai B., *Risk Factors of Superimposed Preeclampsia in Women with Essential Chronic Hypertension Treated before Pregnancy*, PLOS ONE, 8(5), 2013.

Cukrzyca, otyłość i przewlekłe nadciśnienie tętnicze jako czynniki ryzyka stanu przedrzucawkowego u kobiet w ciąży

Streszczenie

Stan przedrzucawkowy jest niebezpiecznym powikłaniem ciąży, charakteryzuje się podwyższonym ciśnieniem tętniczym krwi $>140/90$ mm Hg oraz utratą >300 mg białka na dobę. Może prowadzić do niewydolności wielonarządowej, krwawienia do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) u ciężarnej oraz do przedwczesnego oddzielenia się łożyska i porodu. Stan przedrzucawkowy najczęściej rozpoznaje się po 20. tygodniu ciąży. Celem pracy jest przedstawienie danych dotyczących czynników ryzyka stanu przedrzucawkowego u kobiet w ciąży. Prawidłowo przebiegająca ciąża cechuje się względną opornością na insulinę i hiperinsulinemię, co warunkuje odpowiednie odżywianie i rozwój płodu. Stan przedrzucawkowy jest związany ze zwiększoną hiperinsulinemią, nieprawidłową akumulacją glikogenu i zaburzeniami sygnalizacji insuliny łożyskowej. Udowodniono wiele wspólnych czynników ryzyka dla cukrzycy ciążyowej i stanu przedrzucawkowego, w tym zaawansowany wiek matki, ciążę mnogie, pochodzenie etniczne i otyłość przed ciążą. Otyłość matki niekorzystnie wpływa na płód i niesie ze sobą wiele konsekwencji m.in wzrost śmiertelności płodu po 28. tygodniu ciąży, utrudnioną diagnostykę obrazową oraz zmniejszenie wykrywalności patologii w obrębie serca, twarzoczaszki, pępowiny i kręgosłupa. Ponadto stwierdzono, że u kobiet z przewlekłym nadciśnieniem tętniczym ryzyko występowania stanu przedrzucawkowego wzrasta do 25%. Słowa kluczowe: stan przedrzucawkowy, cukrzyca, otyłość, nadciśnienie tętnicze

Diabetes, obesity and chronic hypertension as risk factors for preeclampsia in pregnant women

Abstract

Preeclampsia is a dangerous complication of pregnancy characterized by elevated blood pressure $>140/90$ mm Hg and loss of >300 mg of protein per day. It can lead to multiple organ failure, central nervous system (CNS) bleeding in the pregnant woman, and premature separation of the placenta and labor. Pre-eclampsia is most commonly diagnosed after the 20th week of pregnancy. The aim of this study is to present data on risk factors for pre-eclampsia in pregnant women. Normal pregnancy is characterized by relative insulin resistance and hyper-insulinemia, which determine adequate nutrition and fetal development. Preeclampsia is associated with increased hyperinsulinemia, abnormal glycogen accumulation, and impaired placental insulin signaling. Many common risk factors for gestational diabetes and preeclampsia have been demonstrated, including advanced maternal age, multiple pregnancies, ethnicity, and pre-pregnancy obesity. Maternal obesity adversely affects the fetus and has many consequences including increased fetal mortality after 28 weeks of gestation, impaired diagnostic imaging, and decreased detection of craniofacial, cardiac, umbilical, and spinal pathologies. In addition, pregnant women with chronic hypertension have been found to have an increased risk of pre-eclampsia of up to 25%.

Keywords: preeclampsia, diabetes, obesity, hypertension

Znaczenie wybranych aminokwasów w zaburzeniach metabolicznych

1. Wprowadzenie

Aminokwasy (ang. *amino acids*, AA) definiowane są jako substancje organiczne zawierające w swojej budowie zarówno grupy aminokwasowe, jak i kwasowe. Ze względu na różnice w łańcuchach bocznych, AA mają znacząco różne właściwości i funkcje biochemiczne [1]. Aminokwasy są podstawowymi elementami syntezy białek, biorą udział w biosyntezie cząsteczek sygnałowych, takich jak neuroprzekazniki i hormony peptydowe. Odgrywają również rolę w syntezie wielu innych cząsteczek, takich jak nukleotydy, poliaminy, glukozaminy, kreatyna i pokrewne węglowodany [2]. Ponieważ aminokwasy są powszechnie zaangażowane w różne szlaki metaboliczne, wyczerpanie lub akumulacja ich metabolitów, obserwowane w niektórych chorobach metabolicznych, prawdopodobnie aktywuje różne patomechanizmy [3].

2. Zaburzenia metaboliczne

Zaburzenia metaboliczne stanowią coraz większe wyzwanie zdrowotne na całym świecie ze względu na ich systematycznie zwiększającą się częstość występowania. Stanowią one grupę zaburzeń, w których nagromadziły się różne współzależne stany patologiczne, obejmujące otyłość, niealkoholowa stłuszczeniową chorobę wątroby (ang. *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD), dyslipidemię, nietolerancję glukozy, insulinooporność (ang. *insulin resistance*, IR), nadciśnienie i cukrzycę typu 2 (ang. *type 2 diabetes*, T2D), które współistniejąc razem, w znacznym stopniu zwiększają częstość występowania chorób sercowo-naczyniowych (ang. *cardiovascular disease*, CVD) [4, 5]. Częstość zachorowania na te zaburzenia wzrasta z każdym rokiem, zarówno w krajach rozwiniętych, jak i rozwijających się. Choroby sercowo-naczyniowe są główną przyczyną umieralności na świecie, odpowiadając za prawie jedną trzecią wszystkich zgonów [6].

3. Aminokwasy w zaburzeniach metabolicznych

Obecne badania nad patogenezą zaburzeń metabolicznych koncentrują się głównie na otyłości brzusznej, lipotoksyczności i insulinooporności. Zaburzenia metaboliczne wiążą się także ze zmianą w metabolizmie niektórych aminokwasów. Cukrzyca typu 2 związana jest z ogólnoustrojowym rozregulowanym środowiskiem metabolicznym, które, choć koncentruje się głównie na glukozie, wyraźnie obejmuje również kwasy tłuszczowe i aminokwasy. Ostatnie badania metaboliczne i lipidomiczne wykazały, że poziomy niektórych aminokwasów w osoczu mogą wzrosnąć podczas insulinooporności. W szczególności aminokwasy rozgałęzione i aromatyczne, takie jak leucyna,

¹ justynkakubacka@wp.pl, Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydgiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

² diag.ka@wp.pl, Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej, Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum im. Ludwika Rydgiera w Bydgoszczy Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

izoleucyna, walina i tyrozyna, są ściśle związane z ryzykiem rozwoju otyłości trzewnej, insulinooporności i cukrzycy typu 2 w przyszłości [7, 8]. Innym z aminokwasów, na który także zwrócono uwagę w tym aspekcie w ostatnich latach jest glicyna należąca do grupy aminokwasów alifatycznych, której znacznie obniżone poziomy w insulinooporności, cukrzycy typu 2 i otyłości, zaobserwowano zarówno w badaniach z udziałem ludzi, jak i zwierząt [9-12]. W obszernym prospektywnym badaniu z 7-letnim okresem obserwacji, wykazano związek z wystąpieniem T2D nie tylko dla wybranych aminokwasów (np. fenyloalanina), ale również dla niektórych cukrów 6-węglowych, jak i kwasów tłuszczowych [13].

Zmiany w profilu aminokwasów w osoczu we wczesnym stadium chorób, spowodowane są głównie otyłością i stanem zapalnym związanym z insulinoopornością, dlatego w większości przypadków zmiany te mogą być odwracalne poprzez zastosowanie odpowiednich interwencji (m.in. żywieniowych, farmakologicznych lub chirurgicznych), zwiększających insulino-wrażliwość.

3.1. Glicyna

Glicyna jest endogennym aminokwasem tworzącym białko o najmniejszej masie cząsteczkowej. Fizjologiczne stężenie glicyny w osoczu waha się między 200 a 300 $\mu\text{mol/L}$. Poza rolę budulcową uczestniczy ona w ekspresji genów oraz jest niezbędna do syntezy glutationu [14]. Niektóre doniesienia sugerują, że glicyna może być warunkowo niezbędna, ponieważ jej ilość syntetyzowana *in vivo* w określonych warunkach bywa niewystarczająca do zaspokojenia potrzeb metabolicznych organizmu. Glicyna odgrywa kluczową rolę w wielu procesach fizjologicznych związanych z chorobami metabolicznymi, a jej przewlekły niedobór może w dłuższej perspektywie wpływać na rozwój tych zaburzeń [15]. Analiza dostępnej literatury sugeruje, że kluczowe szlaki metaboliczne glicyny mogą się różnić w zależności od rodzaju zaburzenia metabolicznego [16]. W badaniach obserwacyjnych obniżone stężenia glicyny w osoczu powiązano między innymi z T2D, NAFLD i otyłością [12, 17-19]. W badaniu grupy dorosłych Japończyków zaobserwowano, że stężenie glicyny było dodatnio skorelowane z insulino-wrażliwością i odwrotnie skorelowane z insulinoopornością [20]. Glicyna miała również największy związek ze zmianą wrażliwości na insulinę, mierzoną za pomocą klamry hiperinsulinowo-euglikemicznej u 399 osób bez cukrzycy [21]. Obniżone stężenie glicyny w osoczu może stanowić silny czynnik predykcyjny incydentów nietolerancji glukozy i T2D [22]. Stwierdzono także, że poziomy glicyny w osoczu są o 9 do 13% niższe u pacjentów z NAFLD, niezależnie od tego, czy u badanych występowała otyłość [17]. Co więcej, w ostatnich latach wskazano na użyteczność wskaźnika GSG (glutaminian-seryna-glicyna), który łączy trzy aminokwasy zaangażowane w syntezę glutationu jako potencjalnego biomarkera NAFLD. Zaobserwowano, że wskaźnik ten jest w znacznym stopniu podwyższony u dorosłych osób z NAFLD potwierdzonym biopsją w porównaniu z grupą kontrolną oraz, że wskaźnik ten jest związany z enzymami wątrobowymi i insulinoopornością wątroby [17]. Wskaźnik GSG może być również użyteczny w wykrywaniu NAFLD w populacji pediatrycznej o zwiększonym ryzyku zachorowania niezależnie od tradycyjnych czynników ryzyka [23]. Sugeruje się, że obniżone stężenie glicyny w osoczu może być spowodowane kilkoma potencjalnymi mechanizmami: zmniejszeniem wchłaniania jelitowego, zmniejszoną biosyntezą oraz zwiększonym katabolizmem lub wydalaniem wraz z moczem [16]. Z kolei interwencje mające na celu

poprawę homeostazy glukozy, takie jak ćwiczenia fizyczne i chirurgia bariatryczna, wiązały się ze wzrostem poziomu glicyny [18, 24]. Również suplementacja glicyną wpływa na poprawę metabolizmu glukozy [25]. Metabolizm ludzkiej glicyny jest zmieniony u osób z otyłością, cukrzycą i NAFLD, a te zaburzenia mogą mieć kluczowe znaczenie dla wyjaśnienia podwyższonego ryzyka sercowo-naczyniowego związanego z tymi schorzeniami. Glicyna jest obecnie uznawana za istotny marker osocza zaburzeń metabolicznych, jednak nadal nie jest jasne, czy spadek poziomu glicyny jest przyczynowo związany z ich patogenezą.

3.2. Aminokwasy rozgałęzione (ang. *branched chain amino acid*, BCAA)

Aminokwasy rozgałęzione, do których zalicza się leucynę (Leu), izoleucynę (Ile) i walinę (Val), są aminokwasami niezbędnymi, to znaczy, że muszą być dostarczane wraz z pożywieniem. Głównymi producentami tych aminokwasów są bakterie jelitowe, zwłaszcza *Escherichia coli* [26]. Oprócz dobrze znanej roli BCAA w metabolizmie białek mięśniowych, w ciągu ostatnich lat wyraźnie wzrosło zainteresowanie rolą BCAA w chorobach kardiometabolicznych, zwłaszcza w kontekście otyłości, insulinooporności i cukrzycy. Zaobserwowano, że zarówno aminokwasy rozgałęzione, jak i aromatyczne są dodatnio skorelowane ze wskaźnikiem masy ciała (*body mass index*, BMI), obwodem talii, trzewną tkanką tłuszczową, skurczowym ciśnieniem krwi (*systolic blood pressure*, SBP), rozkurczowym ciśnieniem krwi (*diastolic blood pressure*, DBP), dysglukemią oraz poziomami insuliny i trójglicerydów [27-29]. Stwierdzono również, że podwyższone poziomy krążących BCAA korelują z otyłością i zwiększonym ryzykiem insulinooporności oraz cukrzycy typu 2 zarówno w modelach ludzkich, jak i zwierzęcych [30,31].

Dowodzono, że u pacjentów z T2D stężenia aminokwasów rozgałęzionych mogą być 1,5-krotnie lub nawet 2-krotnie wyższe niż u osób zdrowych [32,33], a podwyższone stężenie tych aminokwasów może pojawić się nawet na kilka lat przed rozwojem pełnoobjawowej cukrzycy [34]. Podwyższone stężenie aminokwasów aromatycznych i rozgałęzionych zaobserwowano zarówno u pacjentów z cukrzycą typu 1, jak i typu 2 [35, 30]. Zmienione poziomy BCAA odnotowano także w przypadku otyłości. Newgard i wsp. (2009) [7], wykazali zwiększone stężenie tych aminokwasów i ich metabolitów u osób otyłych w porównaniu z osobami szczupłymi. Autorzy stwierdzili, że związek ten prawdopodobnie wynika z nadmiernego poboru BCAA wraz z dietą oraz ze zwiększonego przepływu ich metabolitów przez szlaki kataboliczne. W innym badaniu zaobserwowano zmniejszoną ekspresję i aktywność enzymów odpowiadających za rozkład BCAA w tkance tłuszczowej u osób otyłych, z T2D i IR i wiązało się to z zaburzeniami metabolicznymi, które uległy poprawie po utracie masy ciała [36]. Osoby niezdrowe metabolicznie, w porównaniu z osobami metabolicznie zdrowymi, miały istotnie niższą ekspresję genów związanych z katabolizmem BCAA [37].

Przez wiele lat nie było jasne, czy podwyższone stężenia BCAA są przyczyną czy wtórną konsekwencją insulinooporności. Dostępne dane potwierdzają jednak hipotezę, że wzrost BCAA w osoczu najprawdopodobniej jest konsekwencją insulinooporności. Niedawno opublikowany raport randomizacji Mendla również potwierdza tę hipotezę, wskazując, że wskaźnik HOMA-IR jest związany przyczynowo z wyższymi poziomami BCAA na czczo [38]. Dobrze udokumentowano, że otyłość i insulinooporność są związane ze zmniejszonym katabolizmem BCAA spowodowanym obniżoną aktyw-

nością kompleksu dehydrogenazy rozgałęzionych α -keto-kwasów (BCKDC), co skutkuje akumulacją BCAA i ketokwasów rozgałęzionych [39]. Łącznie, obecne dowody sugerują, że podwyższone poziomy BCAA we krwi mogą być wczesnymi sygnałami pogorszenia kontroli glikemii i wrażliwości na insulinę [40].

3.3. Aminokwasy aromatyczne (ang. *aromatic amino acid*, AAA)

Aminokwasy aromatyczne obejmują fenyloalaninę (Phe), tyrozynę (Tyr) i tryptofan (Trp). Aktualnie istnieje zapotrzebowanie na identyfikację nowych biomarkerów zaburzeń metabolicznych, które umożliwiłyby wczesne wyodrębnienie osób z największym ryzykiem wystąpienia chorób kardiometabolicznych, a także umożliwiających monitorowanie indywidualnego ryzyka metabolicznego, tak, by możliwe było opracowanie i wdrożenie odpowiednich strategii interwencyjnych. Aktualne dowody pochodzące z badań różnych środowisk etnicznych przemawiają za zastosowaniem profilu aminokwasów rozgałęzionych i aminokwasów aromatycznych jako biomarkerów określających zdrowie metaboliczne. Podobnie jak w przypadku BCAA, wykazano ścisły związek między zmianami profili AAA a cukrzycą typu 2, chorobami układu sercowo-naczyniowego, insulinoopornością i otyłością [41, 42]. Podwyższone poziomy tych aminokwasów w osoczu są związane ze zwiększeniem mediatorów prozapalnych i pogorszeniem ogólnego stanu metabolicznego [43]. Obszerne badanie obserwacyjne Framingham Offspring Study prowadzone z udziałem ponad dwóch tysięcy osób przez okres 12 lat wykazało, że poziomy BCAA i AAA są istotnie związane z przyszłym rozwojem cukrzycy [34], a także z rozwojem choroby sercowo-naczyniowej [44]. Potencjalnym mechanizmem leżącym u podstaw związku między AAA i insulinoopornością może być metabolizm AAA do katecholamin, które zmieniają czynność wątroby prowadząc do hiperinsulinemii i dyslipidemii [45]. Obserwacje te sugerują, że niektóre zaburzenia w metabolizmie AAA mogą być częścią wczesnych, jeszcze nie w pełni poznanych zmian metabolicznych poprzedzających rozwój zaburzeń kardiometabolicznych. To sprawia, że zarówno AAA, jak i BCAA mogą stanowić potencjalne, nowe i wczesne biomarkery tych zaburzeń.

Jednym z AAA na który w ostatnim czasie zwrócono szczególną uwagę w kontekście zaburzeń metabolicznych jest tryptofan, ponieważ badania z ostatniej dekady ujawniły złożone i sprzeczne działanie tego aminokwasu i jego metabolitów w regulacji funkcji układu sercowo-naczyniowego [46]. Szlak kinureninowy (ang. *kynurenine pathway*, KP) stanowi główną drogę katabolizmu tryptofanu, odpowiadając za blisko 90% jego degradacji w wątrobie [47]. Szlak ten jest inicjowany przez 2,3-dioksygenazę indoloaminy (ang. *indoleamine 2,3-dioxygenase*, IDO) i 2,3-dioksygenazę tryptofanu (ang. *tryptophan 2,3-dioxygenase*, TDO), enzymy, które katalizują konwersję Trp do kinureniny (ang. *kynurenine*, Kyn). Kyn jest dalej przekształcana w następujące metabolity KP (kinureniny): kwas kinureninowy (Kyna), 3-hydroksykinureninę (3HKyn), kwas antranilowy (AA) i kwas chinolinowy (QA). 3HKyn może być enzymatycznie przekształcany w kwas ksanturenowy (XA) [47]. Przez wiele lat rozregulowanie szlaku kinureninowego było badane głównie w kontekście zaburzeń depresyjnych i neurodegeneracyjnych, jednak dopiero w ostatnich latach zwrócono uwagę, że zarówno enzymy, jak i metabolity tego szlaku mogą wpływać także na zwiększenie częstości występowania chorób sercowo-naczyniowych poprzez regulację stanu zapalnego i zwiększenie aktywacji immunologicznej. Brak równowagi w poziomach krążących metabolitów

KP odnotowano również w otyłości, chorobie sercowo-naczyniowej i cukrzycy typu 2 [48, 49]. Jednak dane dotyczące tych metabolitów w odniesieniu do T2D są skąpe i często sprzeczne w badaniach na ludziach [50, 51], stąd potrzeba dalszych badań wyjaśniających możliwe mechanizmy związku kinurenin z zaburzeniami metabolicznymi.

3.4. Arginina

Na przestrzeni lat wiele badań potwierdziło znaczenie argininy w promowaniu zdrowia układu krążenia poprzez wytwarzanie gazowego tlenku azotu (NO) przez enzym syntazę NO (ang. *NO synthase*, NOS). Uwalnianie NO przez komórki śródbłonna reguluje przepływ krwi i ciśnienie krwi poprzez hamowanie napięcia tętniczego. Ponadto NO łagodzi rozwój miażdżycy poprzez blokowanie odpowiedzi zapalnej w obrębie ściany naczynia. W przeciwieństwie do leucyny, która hamuje wytwarzanie NO przez śródbłonek, wysokie stężenia argininy w osoczu zwiększają dostępność NO i poprawiają wrażliwość naczyń na insulinę. Także homoarginina, pochodna argininy, wykazuje korzystne działanie w układzie krążenia. Niski poziom homoargininy może być niezależnym czynnikiem prognozującym śmiertelność z powodu chorób układu krążenia, podczas gdy wysoki jej poziom wiąże się ze zmniejszoną śmiertelnością. Mechanizm ochronnego oddziaływania homoargininy nie jest znany, ale najprawdopodobniej obejmuje jej zdolność do stymulowania wytwarzania NO poprzez bycie substratem dla NOS [52-54].

Coraz więcej dowodów klinicznych wskazuje, że suplementacja argininy może zmniejszyć otyłość, obniżyć ciśnienie tętnicze krwi, przeciwdziałać utlenianiu i normalizować dysfunkcję śródbłonna, aby doprowadzić do remisji cukrzycy typu 2. Suplementacja diety arginina powoduje obniżenie stężenia glukozy i homocysteiny w osoczu jednocześnie poprawiając relaksację zależną od śródbłonna (wskaźnik funkcji sercowo-naczyniowej) w obu modelach cukrzycy; typu 1 i typu 2 [55]. Leczenie arginina zmniejszyło poziom białej tkanki tłuszczowej, zwiększając jednocześnie masę brunatnej tkanki tłuszczowej u szczurów Zucker z T2D i szczurów z otyłością wywołanych dietą. Arginina i/lub jej metabolity (NO i poliaminy) mogą nasilać proliferację, różnicowanie i funkcję brązowych adipocytów. Ponadto, zarówno masa mięśni szkieletowych, jak i wrażliwość na insulinę zostały wzmocnione w odpowiedzi na suplementację argininy poprzez mechanizmy obejmujące wzrost sygnalizacji mTOR i NO w mięśniach [52]. Podobne obserwacje poczyniono w badaniu z udziałem ludzi, gdzie długotrwałe doustne podawanie argininy spowodowało obniżenie masy tłuszczowej u dorosłych osób otyłych z cukrzycą typu 2 [56]. Zatem suplementacja diety arginina może potencjalnie stanowić jeden z elementów wspomagania leczenia zaburzeń metabolicznych.

3.5. Glutamina

Glutamina to najobficiej występujący i najbardziej wszechstronny aminokwas występujący w organizmie [57]. Jest ona ważnym substratem niezbędnym do syntezy białek, lipidów, puryn, pirymidyn, aminocukrów, fosforanu dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (NADPH), glukozaminy, przeciwutleniaczy i wielu innych szlaków biosyntetycznych zaangażowanych w regulację funkcji komórek. Jednak pomimo dobrze znanego wpływu glutaminy na stan zdrowia, jej oddziaływanie na układ sercowo-naczyniowy zostało udokumentowane stosunkowo niedawno [58]. We wspomnianym wcześniej, przełomowym badaniu kohortowym autorstwa Cheng S. i wsp. (2012) [28],



doniesiono, że stosunek glutaminy do glutaminianu w osoczu jest ujemnie skorelowany ze wskaźnikiem masy ciała (ang. *body mass index*, BMI), triglicerydami, insuliną i ciśnieniem krwi oraz dodatkowo skorelowany z lipoproteinami o wysokiej gęstości (ang. *high-density lipoprotein*, HDL), co wiąże się z niższym ryzykiem zachorowania na cukrzycę typu 2. Tymczasem stężenia glutaminianu i BCAA w osoczu zostały w tym badaniu powiązane z niekorzystnymi parametrami metabolicznymi [28].

Pozytywne oddziaływanie glutaminy obejmujące m.in. obniżenie skurczowego ciśnienia krwi i stężenia glukozy na czczo, odnotowano także stosując suplementację u osób z T2D przez okres 6 tygodni [59]. Za potencjalne mechanizmy korzystnego oddziaływania glutaminy na zdrowie kardiometaboliczne uważa się przede wszystkim jej zdolność do stymulacji uwalniania insuliny przez komórki β trzustki, transkrypcję genów insulinozależnych i zwiększoną dyspozycję insuliny oraz zwiększone uwalnianie peptydu glukagonopodobnego 1 [60].

4. Podsumowanie

Coraz więcej dowodów sugeruje, że niektóre aminokwasy mogą regulować różne procesy metaboliczne, w tym metabolizm glukozy i lipidów. Dane pochodzące zarówno z populacji amerykańskich, europejskich, jak i azjatyckich wiążą glicynę, BCAA i AAA z insulinoopornością, T2DM i ryzykiem kardiometabolicznym. Jednak pomimo wielu przeprowadzonych do tej pory badań różnego rodzaju z udziałem zarówno zwierząt, jak i ludzi pochodzących z różnych populacji, mechanizm zmienionego metabolizmu aminokwasów w patologiach związanych z zaburzeniami metabolicznymi nie jest jeszcze w pełni poznany. Wiele dowodów wskazuje na to, że aminokwasy odgrywają fundamentalną rolę w układzie sercowo-naczyniowym, niektóre z nich na poziomie etiopatologii zaburzeń metabolicznych, inne zaś (m.in. glutamina i glicyna), mogą stanowić potencjalne elementy wspomagania leczenia tych zaburzeń. Z pewnością patogeneza zaburzeń metabolicznych jest wieloczynnikowa i złożona, dlatego potrzeba większej ilości danych celem pogłębienia i uzupełnienia obecnej wiedzy na temat najlepszych interwencji służących do leczenia rozregulowanego środowiska metabolicznego. Dotychczasowe wyniki sugerują, że zmiany stężeń aminokwasów rozgałęzionych i aromatycznych zidentyfikowane przy użyciu technik metabolomicznych, jak również kolejne metabolity tych aminokwasów, mogą być przydatne w identyfikacji nowych biomarkerów kardiometabolicznych.

Literatura

1. Brosnan J.T., *Amino acids, then and now – a reflection on Sir Hans Krebs's contribution to nitrogen metabolism*, IUBMB Life, 52, 2001, s. 265-270.
2. Yahyaoui R., Perez-Frias J., *Amino Acid Transport Defects in Human Inherited Metabolic Disorders*, International journal of molecular sciences, 21, 2019.
3. Kölker S., *Metabolism of amino acid neurotransmitters: the synaptic disorder underlying inherited metabolic diseases*, Journal of Inherited Metabolic Disease, 41, 2018, s. 1055-1063.
4. Diehl A.M., Day C., Cause D.C., *Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis*, The New England journal of medicine, 377, 2017, s. 2063-2072.
5. Agus A., Clement K., Sokol H., *Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders*, Gut, 70, 2021, s. 1174-1182.
6. Benjamin E.J., Blaha M.J., Chiuve S.E., Cushman M., Das S.R., Deo R., de Ferranti S.D., Floyd J., Fornage M., Gillespie C., Isasi C.R., Jiménez M.C., Jordan L.C., Judd S.E., Lackland D., Lichtman J.H., Lisabeth L., Liu S., Longenecker C.T., Mackey R.H.,

- Matsushita K., Mozaffarian D., Mussolino M.E., Nasir K., Neumar R.W., Palaniappan L., Pandey D.K., Thiagarajan R.R., Reeves M.J., Ritchey M., Rodriguez C.J., Roth G.A., Rosamond W.D., Sasso C., Towfighi A., Tsao C.W., Turner M.B., Virani S.S., Voeks J.H., Willey J.Z., Wilkins J.T., Wu J.H., Alger H.M., Wong S.S., Muntner P., *American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2017 update*, Circulation, 135, 2017.
7. Newgard C.B., An J., Bain J.R., Muehlbauer M.J., Stevens R.D., Lien L.F., Haqq A.M., Shah S.H., Arlotto M., Slentz C.A., Rochon J., Gallup D., Ilkayeva O., Wenner B.R., Yancy W.S., Eisensohn H., Musante G., Surwit R.S., Millington D.S., Butler M.D., Svetkey L.P., *A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance*, Cell Metabolism, 9, 2009, s. 311-326.
 8. Würtz P., Mäkinen V.P., Soininen P., Kangas A.J., Tukiainen T., Kettunen J., Savolainen M.J., Tammelin T., Viikari J.S., Rönnemaa T., Kähönen M., Lehtimäki T., Ripatti S., Raitakari O.T., Järvelin M.R., Ala-Korpela M., *Metabolic signatures of insulin resistance in 7,098 young adults*, Diabetes, 61, 2012, s. 1372-1380.
 9. Lustgarten M.S., Price L.L., Phillips E.M., Fielding R.A., *Serum glycine is associated with regional body fat and insulin resistance in functionally-limited older adults*, PLoS One, 8, 2013.
 10. Palmer N.D., Stevens R.D., Antinozzi P.A., Anderson A., Bergman, R.N., Wagenknecht, L.E., Newgard C.B., Bowden D.W., *Metabolomic profile associated with insulin resistance and conversion to diabetes in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study*, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 100, 2015.
 11. Felig P., Marliss E., Cahill G.F.Jr., *Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity*, The New England journal of medicine, 281, 1969, s. 811-816.
 12. Okekunle A.P., Li Y., Liu L., Du S., Wu X., Chen Y., Li Y., Qi J., Sun C., Feng R., *Abnormal circulating amino acid profiles in multiple metabolic disorders*, Diabetes research and clinical practice, 132, 2017, s. 45-58.
 13. Floegel A., Stefan N., Yu Z., Mühlenbruch K., Drogan D., Joost H.G., Fritsche A., Häring H.U., Hrabě de Angelis M., Peters A., Roden M., Prehn C., Wang-Sattler R., Illig T., Schulze M.B., Adamski J., Boeing H., Pischon T., *Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach*, Diabetes, 62, 2013, s. 639-648.
 14. Durkin P.J., Friedberg F. *The synthesis of glutathione in torula utilis studied with 14C-carboxyl labeled glycine*, Biochimica et biophysica acta, 9, 1952, s. 105-106.
 15. Meléndez-Hevia E., De Paz-Lugo P., Cornish-Bowden A., Cárdenas M.L., *A weak link in metabolism: The metabolic capacity for glycine biosynthesis does not satisfy the need for collagen synthesis*, Journal of biosciences, 34, 2009, s. 853-872.
 16. Imenshahidi M., Hossenzadeh H., *Effects of glycine on metabolic syndrome components: a review*, Journal of endocrinological investigation, 45, 2022, s. 927-939.
 17. Gaggini M., Carli F., Rosso C., Buzzigoli E., Marietti M., Della Latta V., Ciociaro D., Abate M.L., Gambino R., Cassader M., Bugianesi E., Gastaldelli A., *Altered amino acid concentrations in NAFLD: Impact of obesity and insulin resistance*, Hepatology, 67, 2018, s. 145-158.
 18. Glynn E.L., Piner L.W., Huffman K.M., Slentz C.A., Elliot-Penry L., AbouAssi H., White P.J., Bain J.R., Muehlbauer M.J., Ilkayeva O.R., Stevens R.D., Porter Starr K.N., Bales C.W., Volpi E., Brosnan M.J., Trimmer J.K., Rolph T.P., Newgard C.B., Kraus W.E., *Impact of combined resistance and aerobic exercise training on branchedchain amino acid turnover, glycine metabolism and insulin sensitivity in overweight humans*, Diabetologia, 58, 2015, s. 2324-2335.



19. Drabkova P., Sanderova J., Kovarik J., Kandar R., *An assay of selected serum amino acids in patients with type 2 diabetes mellitus*, Advances in clinical of experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University, 24, 2015, s. 447-451.
20. Takashina C., Tsujino I., Watanabe T., Sakaue S., Ikeda D., Yamada A., Sato T., Ohira H., Otsuka Y., Oyama-Manabe N., Ito Y.M., Nishimura M., *Associations among the plasma amino acid profile, obesity, and glucose metabolism in Japanese adults with normal glucose tolerance*, Nutrition&metabolism, 13, 2016.
21. Gall W.E., Beebe K., Lawton K.A., Adam K.P., Mitchell M.W., Nakhle P.J., Ryals J.A., Milburn M.V., Nannipieri M., Camastra S., Natali A., Ferrannini E., RISC Study Group, *α -hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population*, PLoS ONE, 5, 2010.
22. Wang-Sattler R., Yu Z., Herder C., Messias A.C., Floegel A., He Y., Heim K., Campillos M., Holzapfel C., Thorand B., Grallert H., Xu T., Bader E., Huth C., Mittelstrass K., Döring A., Meisinger C., Gieger C., Prehn C., Roemisch-Margl W., Carstensen M., Xie L., Yamanaka-Okumura H., Xing G., Ceglarek U., Thiery J., Giani G., Lickert H., Lin X., Li Y., Boeing H., Joost H.G., de Angelis M.H., Rathmann W., Suhre K., Prokisch H., Peters A., Meitinger T., Roden M., Wichmann H.E., Pischon T., Adamski J., Illig T., *Novel biomarkers for pre-diabetes identified by metabolomics*, Molecular systems biology, 8, 2012.
23. Leonetti S., Herzog R., Caprio S., Santoro N., Trico D., *Glutamate-Serine-Glycine Index: A Novel Potential Biomarker in Pediatric Non-Alcoholic Fatty Liver Disease*, Children (Basel), 7, 2020.
24. Tulipani S., Palau-Rodriguez M., Minarro Alonso A., Cardona F., Marco-Ramell A., Zonja B., Lopez de Alda M., Munoz-Garach A., Sanchez-Pla A., Tinahones F.J., Andres-Lacueva C., *Biomarkers of morbid obesity and prediabetes by metabolomic profiling of human discordant phenotypes*, Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry, 463, 2016, s. 53-61.
25. Gonzalez-Ortiz M., Medina-Santillan R., Martinez-Abundis E., von Drateln C.R., *Effect of glycine on insulin secretion and action in healthy first-degree relatives of type 2 diabetes mellitus patients*, Hormone and Metabolic Research, 33, 2001, s. 358-360.
26. Berg J.M., Stryer L., Tymoczko J.L., Gatto G.J., *Biochemistry. 8th ed.*, Macmillan Education, London UK, 2015, s. 41-46.
27. Yamakado M., Nagao K., Imaizumi A., Tani M., Toda A., Tanaka T., Jinzu H., Miyano H., Yamamoto H., Daimon T., Horimoto K., Ishizaka Y., *Plasma Free Amino Acid Profiles Predict Four-Year Risk of Developing Diabetes, Metabolic Syndrome, Dyslipidemia, and Hypertension in Japanese Population*, Scientific reports, 5, 2015.
28. Cheng S., Rhee E.P., Larson M.G., Lewis G.D., McCabe E.L., Shen D., Palma M.J., Roberts L.D., Dejam A., Souza A.L., Deik A.A., Magnusson M., Fox C.S., O'Donnell C.J., Vasani R.S., Melander O., Clish C.B., Gerszten R.E., Wang T.J., *Metabolite Profiling Identifies Pathways Associated With Metabolic Risk in Humans*, Circulation, 125, 2012, s. 2222-2231.
29. Kubacka J., Cembrowska P., Sypniewska G., Stefanska A., *The Association between Branched-Chain Amino Acids (BCAAs) and Cardiometabolic Risk Factors in Middle-Aged Caucasian Women Stratified According to Glycemic Status*, Nutrients, 13, 2021.
30. Lynch C.J., Adams S.H., *Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance*, Nature reviews, Endocrinology, 10, 2014, s. 723-736.
31. White P.J., Lapworth A.L., An J., Wang L., McGarrah R.W., Stevens R.D., Ilkayeva O., George T., Muehlbauer M.J., Bain J.R., Trimmer J.K., Brosnan M.J., Rolph T.P., Newgard C.B., *Branched-chain amino acid restriction in Zucker-fatty rats improves muscle insulin sensitivity by enhancing efficiency of fatty acid oxidation and acyl-glycine export*, Molecular Metabolism, 5, 2016, s. 538-551.



32. Savolainen O., Fagerberg B., Vendelbo Lind M., Sandberg A.-S., Ross A.B., Bergström G., *Biomarkers for predicting type 2 diabetes development-Can metabolomics improve on existing biomarkers?*, PLoS ONE, 12, 2017.
33. Guasch-Ferré M., Hruby A., Toledo E., Clish C.B., Martínez-González M.A., Salas-Salvadó J., Hu F.B., *Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis*, Diabetes Care, 39, 2016, s. 833-846.
34. Wang T.J., Larson M.G., Vasan R.S., Cheng S., Rhee E.P., McCabe E., Lewis G.D., Fox C.S., Jacques P.F., Fernandez C., O'Donnell C.J., Carr S.A., Mootha V.K., Florez J.C., Souza A., Melander O., Clish C.B., Gerszten R.E., *Metabolite profiles and the risk of developing diabetes*, Nature medicine, 17, 2011, s. 448-453.
35. Bloomgarden Z., *Diabetes and branched-chain amino acids: What is the link?*, Journal of Diabetes, 10, 2018, s. 350-352.
36. Laferrère B., Pietiläinen K., Boirie Y., *Weight Loss and Branched Chain Amino Acids and Their Metabolites*, Branched Chain Amino Acids in Clinical Nutrition: Volume 2, Humana Press, Springer Science Business Media, New York, USA, 2015, s. 251-262.
37. Lackey D.E., Lynch C.J., Olson K.C., Mostaedi R., Ali M., Smith W.H., Karpe F., Humphreys S., Bedinger D.H., Dunn T.N., Thomas A.P., Oort P.J., Kieffer D.A., Amin R., Bettaieb A., Haj F.G., Permana P., Anthony T.G., Adams S.H., *Regulation of adipose branched-chain amino acid catabolism enzyme expression and cross-adipose amino acid flux in human obesity*, American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 304, 2013.
38. Mahendran Y., Jonsson A., Have C.T., Allin K.H., Witte D.R., Jørgensen M.E., Grarup N., Pedersen O., Kilpeläinen T.O., Hansen T., *Genetic evidence of a causal effect of insulin resistance on branched-chain amino acid levels*, Diabetologia, 2017, 60, s. 873-878.
39. Zhou M., Shao J., Wu C.Y., Shu L., Dong W., Liu Y., Chen M., Wynn R.M., Wang J., Wang J., Gui W.J., Qi X., Lusi A.J., Li Z., Wang W., Ning G., Yang X., Chuang D.T., Wang Y., Sun H., *Targeting BCAA catabolism to treat obesity-associated insulin resistance*, Diabetes, 68, 2019, s. 1730-1746.
40. Krebs M., Krssak M., Bernroider E., Anderwald C., Brehm A., Meyerspeer M., Nowotny P., Roth E., Waldhäusl W., Roden M., *Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans*, Diabetes, 51, 2002, s. 599-605.
41. Weng L., Quinlivan E., Gong Y., Beitelshes A.L., Shahin M.H., Turner S.T., Chapman A.B., Gums J.G., Johnson J.A., Frye R.F., Garrett T.J., Cooper-DeHoff R.M., *Association of branched and aromatic amino acids levels with metabolic syndrome and impaired fasting glucose in hypertensive patients*, Metabolic syndrome and related disorders, 13, 2015, s. 195-202.
42. Nagao K., Yamakado M., *The role of amino acid profiles in diabetes risk assessment*, Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 19, 2016, s. 328-335.
43. Newgard C.B., *Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance*, Cell metabolism, 15, 2012, s. 606-614.
44. Magnusson M., Lewis G.D., Ericson U., Orho-Melander M., Hedblad B., Engström G., Ostling G., Clish C., Wang T.J., Gerszten R.E., Melander O., *A diabetes-predictive amino acid score and future cardiovascular disease*, European heart journal, 34, 2013, s. 1982-1989.
45. Bi X., Henry C.J., *Plasma-free amino acid profiles are predictors of cancer and diabetes development*, Nutrition&diabetes, 7, 2017.
46. Song P., Ramprasath T., Wang H., Zou M.H., *Abnormal kynurenine pathway of tryptophan catabolism in cardiovascular diseases*, Cellular and Molecular Life Sciences, 74, 2017, s. 2899-2916.
47. Badawy A.A., *Kynurenine pathway of tryptophan metabolism: Regulatory and functional aspects*, International Journal of tryptophan research, 10, 2017.

48. Chen T., Zheng X., Ma X., Bao Y., Ni Y., Hu C., Rajani C., Huang, F., Zhao A., Jia W., *Tryptophan Predicts the Risk for Future Type 2 Diabetes*, PLoS One, 11, 2016.
49. Matsuoka K., Kato K., Takao T., Ogawa M., Ishii Y., Shimizu F., Masuda J., Takada A., *Concentrations of various tryptophan metabolites are higher in patients with diabetes mellitus than in healthy aged male adults*, Diabetology International, 6, 2016, s. 69-75.
50. Munipally P.K., Agraharm S.G., Valavala V.K., Gundae S., Turlapati N.R., *Evaluation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression and kynurenine pathway metabolites levels in serum samples of diabetic retinopathy patients*, Archives of physiology and biochemistry, 117, 2011, s. 254-258.
51. Li M., Kwok M.K., Fong S.S.M., Schooling C.M., *Indoleamine 2,3-dioxygenase and ischemic heart disease: a Mendelian Randomization study*, Scientific reports, 9, 2019.
52. Wu G., Meininger C.J., *Nitric oxide and vascular insulin resistance*, Biofactors, 35, 2009, s. 21-27.
53. Durante W., *Regulation of l-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells*, Cell biochemistry and biophysics, 35, 2001, s. 19-34.
54. Forstermann U., Sessa W.C., *Nitric oxide synthase: regulation and function*, European heart journal, 33, 2012, s. 829-837.
55. Hu S., Han M., Razaeei A., Li D., Wu G., Ma X., *L-Arginine Modulates Glucose and Lipid Metabolism in Obesity and Diabetes*, Current protein&peptide science, 18, 2017, s. 599-608.
56. Lucotti P., Setola E., Monti L.D., Galluccio E., Costa S., Sandoli E.P., Fermo I., Rabaiotti G., Gatti R., Piatti P., *Beneficial effect of a longterm oral L-arginine treatment added to a hypocaloric diet and exercise training program in obese, insulin-resistant type 2 diabetic patients*, American journal of physiology. Endocrinology and metabolism, 291, 2006.
57. Cruzat V., Rogero M.M., Keane K.N., Curi R., Newsholme P., *Glutamine: metabolism and immune function, supplementation, and clinical translation*, Nutrients, 2018, 10, s. 1564.
58. Bertero T., Perk D., Chan S.Y., *The molecular rationale for therapeutic targeting of glutamine metabolism in pulmonary hypertension*, Expert opinion of therapeutic targets, 23, 2019, s. 511-524.
59. Mansour A., Tehrani M.R.M., Qorbani M., Heshmat R., Larijani B., Hosseini S., *Effect of glutamine supplementation on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes*, Nutrition, 31, 2015, s. 119-126.
60. Greenfield J.R., Farooqi I.S., Keogh J.M., Henning E., Habib A.M., Blackwood A., Reimann F., Holst J.J., Gribble F.M., *Oral glutamine increases circulating glucagon-like peptide 1, glucagon, and insulin concentrations in lean, obese, type 2 diabetic patients*, The American journal of clinical nutrition, 89, 2009, s. 106-113.

Znaczenie wybranych aminokwasów w zaburzeniach metabolicznych

Streszczenie

Zaburzenia metaboliczne stanowią grupę zaburzeń obejmujących różne współzależne stany patologiczne do których należą: otyłość, niealkoholowa stłuszczeniowa choroba wątroby, dyslipidemia, nietolerancja glukozy, insulinooporność, nadciśnienie i cukrzyca typu 2, które współwystępując razem, w znacznym stopniu zwiększają częstość występowania chorób sercowo-naczyniowych. Dotychczasowe doniesienia wskazują, że aminokwasy odgrywają fundamentalną rolę w fizjologii i patologii układu sercowo-naczyniowego. Aminokwasy są podstawowymi elementami syntezy białek, biorą też udział między innymi w biosyntezie cząsteczek sygnałowych, takich jak neuroprzekazniki i hormony peptydowe. Liczne doniesienia naukowe potwierdziły znaczenie argininy w promowaniu zdrowia naczyń poprzez wytwarzanie gazowego tlenu azotu. Niedawno wykazano również, że aminokwasy aromatyczne i rozgałęzione modulują funkcję naczyń poprzez tworzenie licznych metabolitów, w tym gazów (amoniak, tlenek węgla, siarkowodor i dwutlenek siarki). Te aminokwasy i ich metabolity zachowują homeostazę naczyń poprzez regulację krytycznych procesów komórkowych, w tym proliferację, migrację, różnicowanie, apoptozę, kurczliwość i starzenie. Ponadto niektóre z nich wywierają silne działanie przeciwzapalne i przeciwutleniające w układzie krążenia

oraz blokują akumulację lipidów w ścianach tętnic. Jednak w niektórych przypadkach metabolizm tych aminokwasów poprzez dyskretne szlaki skutkuje wytwarzaniem związków, które sprzyjają chorobom naczyń. Słowa kluczowe: zaburzenia metaboliczne, cukrzyca typu 2, kardiometaboliczne czynniki ryzyka, aminokwasy rozgałęzione, aminokwasy aromatyczne

The importance of selected amino acids in metabolic disorders

Abstract

Metabolic disorders are a group of disorders including various interdependent pathological conditions, including obesity, non-alcoholic fatty liver disease, dyslipidemia, glucose intolerance, insulin resistance, hypertension and type 2 diabetes, which together significantly increase the incidence of cardiovascular diseases. Previous reports indicate that amino acids play a fundamental role in the physiology and pathology of the cardiovascular system. Amino acids are the basic elements of protein synthesis, they also take part in the biosynthesis of signaling molecules such as neurotransmitters and peptide hormones. Numerous scientific reports have confirmed the importance of arginine in promoting vascular health through the production of nitric oxide gas. Aromatic and branched amino acid have also recently been shown to modulate vessel function by forming numerous metabolites, including gases (ammonia, carbon monoxide, hydrogen sulfide, and sulfur dioxide). These amino acids and their metabolites maintain vascular homeostasis by regulating critical cellular processes including proliferation, migration, differentiation, apoptosis, contractility, and aging. In addition, some of them exert a strong anti-inflammatory and antioxidant effect in the circulatory system and block the accumulation of lipids in the artery walls. In some cases, however, the metabolism of these amino acids via discrete pathways results in the production of compounds that promote vascular disease.

Keywords: metabolic disorders, type 2 diabetes, cardiometabolic risk factors, branched chain amino acid, aromatic amino acid

Epidemia odry (ang. *rubeola*) jako realne zagrożenie – analiza problemu spadku liczby szczepień przeciwko chorobom zakaźnym

1. Rys historyczny szczepień ochronnych

Albert Einstein, wybitny fizyk i twórca teorii względności podejmującej zagadnienia związane z czasem i przestrzenią powiedział kiedyś, iż *Wyobraźnia jest ważniejsza niż wiedza. Wiedza jest ograniczona – jest tym, co wiemy i rozumiemy teraz, a wyobraźnia otacza świat – także to, co kiedykolwiek poznamy i zrozumiemy* [1]. Cały rozwój świata nie tylko technologiczny, ale także medyczny opiera się o tę tezę wielkiego naukowca, bowiem bez poszukiwania tego co nieodkryte nie byłoby tego czym dzisiaj świat dysponuje, aby ułatwić ludziom życie. Najwięcej odkryć medycznych przypada na wiek XIX i XX, choć te pierwsze, przełomowe, przypadają na wiek XVIII. Każde z nich wiązało się z pewnymi kontrowersjami i niepewnością, czy nauka przyjmie dany wynalazek, czy też go odrzuci na podstawie różnych uprzedzeń, bądź trwałego przywiązania do ówczesnej wiedzy [2]. Wiejski lekarz Edward Jenner na podstawie swoich obserwacji wyciągnął wnioski, iż osoby pracujące przy krowach z objawami „ospy krowianki”, rzadziej chorują na ospę prawdziwą, która w XVIII w. zbierała śmiertelne żniwo wśród ludności. Na tej podstawie postanowił dokonać eksperymentu. Z krost i bąbli na dłoni kobiety zakażonej bydłęcym wirusem pobrał płyn i 14 maja 1796r. zaaplikował go do nacięć które wykonał na ramieniu 8-letniego chłopca [2]. Datę tę uznaje się za pierwszą na świecie, świadomą procedurę szczepienia. Zdrowy dotychczas chłopiec rozwinął jedynie niegroźną dla życia łagodną postać tej odzwierzęcej choroby [3]. W późniejszym czasie lekarz ponownie zaszczepił dziecko, tym razem wykorzystując materiał z krost ospy prawdziwej. To drugie szczepienie nie wywołało żadnych symptomów chorobowych, co pozwoliło Jennerowi na wyciągnięcie wniosków o tym, że chłopiec po wykonanym eksperymencie jest odporny na zachorowanie na ospę prawdziwą [4]. Ten eksperyment otworzył drogę do lepszego zrozumienia działania układu immunologicznego oraz rozpoczął nową erę wakcynacji. Kolejnym krokiem były coraz to nowsze szczepienia ochronne (błonica, tężec, wąglik, gruźlica itd.) bazujące na najnowszych dostępnych technologiach, kończąc współcześnie na technologii mRNA, która w czasie pandemii COVID-19 okazała się być bardzo pomocną w walce z infekcją tym wirusem, istotnie zmniejszając śmiertelność [5].

2. Kalendarz szczepień

Polityka prozdrowotna wielu krajów opiera się nie tylko na badaniach screeningowych czy promowaniu zdrowego trybu życia, ale także na stosowaniu szczepień ochronnych mających na celu ograniczenie do minimum zachorowań na określone

¹ dawid.pajor@student.uj.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe Humanistyki Medycznej, Wydział lekarski kierunek lekarski Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum.

² mateusz.wylaz@student.uj.edu.pl, Studenckie Koło Naukowe Humanistyki Medycznej, Wydział lekarski kierunek lekarski Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum.

choroby [6]. W myśl tego wiele krajów wprowadziło regulacje prawne dotyczące tych procedur medycznych, a wynikiem ich jest kalendarz szczepień, czyli dokument rekomendujący rodzaj szczepienia i czas w jakim powinno się je wykonać. Program szczepień ochronnych w Polsce zmienia się w odpowiedzi na nowe odkrycia naukowe i stanowiska organizacji zajmujących się szczepieniami ochronnymi. Wprowadzenie obowiązkowej immunizacji przeciw wybranym chorobom zakaźnym w znaczny sposób ograniczyło, lub w niektórych przypadkach wyeliminowało je z populacji [7]. Liczne badania epidemiologiczne wskazują, iż wysoki odsetek osób zaszczepionych pozwala uzyskać odporność zbiorowiskową i ograniczyć do minimum ilość nowych przypadków choroby. WHO (ang. *World Health Organization*) uznało w 1980 r. ospę prawdziwą za eradykowaną, czyli zwalczoną na całym świecie. Niektóre z chorób jak np. drankuloza, choroba Heinego-Medina czy odra są, bądź były bliskie dołączenia do grupy chorób wyeliminowanych [8]. Ze względu na coraz intensywniej działające ruchy antyszczepionkowe i niewystarczające egzekwowanie dopełnienia obowiązku szczepienia dzieci przez organy państwowe, liczba szczepień spada, a skutki tego są dotrzelalne coraz bardziej [9].

3. „Dawno zapomniany” wirus odry

Odra jest chorobą zakaźną wywołaną przez patogen z rodziny paramyksowirów, charakteryzującą się gorączką, gruboplamistą wysypką oraz zapaleniem dróg oddechowych [10]. Najgroźniejszymi z powikłań tej choroby są zapalenie płuc, mięśnia sercowego, mózgu, czy mogące wystąpić nawet kilka lat po zakażeniu podostre stwardniające zapalenie mózgu [11]. W latach 2010-2016 zaobserwowano najniższą w historii liczbę przypadków osób chorujących na odrę. Jednak od roku 2016 obserwuje się gwałtownie wzrastającą liczbę nowych zachorowań [12]. Według danych WHO liczba chorych w regionie europejskim wyniosła odpowiednio: w 2016 r. – 5 273 przypadki, w 2017 r. – 25 863 przypadki, w 2018r. – 82 596 przypadków, a w roku 2019 aż 104 248 przypadków [13]. Dane te prezentują ogromny wzrost liczby zakażeń z roku na rok. Liczne artykuły naukowe donoszą, iż główną przyczyną tego zjawiska jest spadek liczby szczepień oraz wzrost migracji (rozwój transportu) osób z krajów o wysokim odsetku występowania wirusa odry do krajów o niskim odsetku jego występowania [14]. Głównym problemem związanym z chorobą jest jej ogromna zakaźność, która skutkuje 90-95% prawdopodobieństwem rozwiniecia się choroby po kontakcie u osoby niezaszczepionej [15]. Wynika z tego, że wirus odry ma ogromny potencjał epidemiczny. Niestety leczenie przyczynowe nie istnieje, dlatego jedyną formą zapobiegania temu zjawisku w chwili obecnej są szczepienia ochronne.

Najnowsze badania z 2015r., które ukazały się w czasopiśmie *Science* wykazały, iż przechorowanie odry ma długofalowy wpływ na osłabienie układu immunologicznego, co wiąże się ze zwiększoną umieralnością na inne choroby zakaźne [16]. W 2018 r. zidentyfikowano elementy, które zostają uszkodzone przez wirusa. Cały proces prowadzi do zmniejszenia ilości limfocytów B, które są odpowiedzialne m.in. za produkcję przeciwciał w odpowiedzi na kontakt z patogenem [17].

4. Ruchy antyszczepionkowe

Pierwsze zorganizowane ruchy antyszczepionkowe pojawiły się w odpowiedzi na odkrycie wspomnianej pierwszej na świecie szczepionki przeciwko ospie prawdziwej. Ruchy „przeciwko” to element integralny wielu aspektów życia. To zupełnie naturalne,

że wśród całego społeczeństwa znajdzie się zawsze pewien odsetek osób, które nie poprą lub będą przeciwne określonym działaniom, na przykład szczepieniom ochronnym [18]. Jednym z najjaskrawszych przejawów tego procesu była panika przed szczepieniami uodparniającymi przeciw chorobom wieku dziecięcego, która wybuchła w 1998 r., za sprawą artykułu opublikowanego wtedy w Lancecie. Przedstawione tam wyniki badań naukowych zszokowały świat naukowy. Mianowicie autor doktor Andrew Wakefield opisał związek szczepień (dokładnie szczepionką skojarzoną MMR – odra, świnka, różyczka) z wystąpieniem autyzmu [19]. Szybko zainteresowano się odkryciem naukowca i obalono wyniki jego badań. W toku prowadzonego dochodzenia okazało się, iż lekarz ten dzięki publikacji nieprawdziwych danych dotyczących powikłań poszczepiennych miał otrzymać korzyść majątkową. Został w związku z tym ukarany utratą prawa do wykonywania zawodu lekarza [20], a czasopismo wycofało się oficjalnie z firmowania swoim tytułem fałszywych badań i artykuł został oficjalnie anulowany. Pomimo tego zakłamanie wyników badań, za sprawą mediów, utkwiły w pamięci wielu ludzi. Po dziś dzień można usłyszeć, iż niektórzy rodzice nie szczepią dzieci, gdyż może to wywołać autyzm [21].

Z badań przeprowadzonych przez CBOS (Centrum Badania Opinii Społecznej) w 2013 i 2017 roku wynika, iż najczęstszą przyczyną odrzucania szczepień u dzieci jest obawa o nieporządane odczyny poszczepienne (40% ankietowanych). Okazało się także, iż taki sam odsetek ankietowanych nie uważa szczepień za dobro ludzkości, lecz konieczność związaną z zyskiem dla koncernów farmaceutycznych [22, 23]. Wyniki wskazują na to, że znaczna liczba osób traktuje szczepienia jako nie do końca potrzebne i skuteczne, a w myślach wielu powstają wciąż nowe teorie spiskowe.

5. Jak powstrzymać rozwój epidemii odry?

Kluczową odpowiedzią na to pytanie jest wprowadzenie obowiązkowych szczepień szczepienie przeciwko wirusowi odry [24]. W przypadku zakażenia nie dysponujemy żadnymi lekami celowanymi, możemy zwalczać jedynie objawy choroby poprzez podawanie płynów oraz leków przeciwgorączkowych.

Słusznym krokiem wydaje się być edukacja, czyli poszerzenie wiedzy obywateli o rzetelne doniesienia naukowe na temat profilaktyki chorób zakaźnych. Takie działania niewątpliwie miałyby wpływ na podejmowane przez rodziców decyzje, a wszelkie wątpliwości powinny być rozwiewane w gabinecie lekarskim, bądź w innym kompetentnym źródle informacji [7].

Jak wiadomo, współcześnie media społecznościowe odgrywają ogromną rolę w szczyrzeniu informacji na wiele tematów, w tym szczepień ochronnych. Narzędzia te wykorzystywane są oczywiście przez różne grupy społeczne do upowszechniania informacji zarówno prawdziwych, jak i fałszywych. Dzięki internetowi docierają one do dużej grupy odbiorców [25]. Pożadaniem byłoby szerzenie prawdziwej, rzetelnej wiedzy na temat szczepień również tą drogą. Sami lekarze coraz częściej używają mediów społecznościowych, celem dotarcia do jeszcze większego grona pacjentów. Na swoich profilach dodają najnowsze nowinki ze świata medycyny czy też prezentują wiedzę medyczną w sposób przystępny dla każdego [26].

Ciekawym zagadnieniem poruszonym przez prawników jest zjawisko karalności za szerzenie fake-newsów (nieprawdziwych informacji). Z jednej strony rozpowszechnianie takich informacji jest szkodliwe dla społeczeństwa i powinno się zakazać takich praktyk,

z drugiej strony ograniczałoby to wolność słowa. Prawo polskie nie odnosi się stricte do karalności fake-newsów (karane jest jedynie „kłamstwo oświęcimskie”). Uszczelnienie tych przepisów mogłoby pomóc w ograniczeniu szerzenia nieprawdziwych informacji, a co zatem idzie zachęcić do szczepień i zmniejszeniu ryzyka wystąpienia epidemii odrzy [27].

W stanie Kalifornia (Stany Zjednoczone Ameryki) dzieci, które nie posiadają odpowiednich szczepień nie są przyjmowane do szkół, przedszkoli czy żłobków [28]. Takie rozwiązanie chociaż bardzo radykalne, również mogłoby poprawić sytuację szczepień w wielu krajach. Godzi to jednak tak jak karalność fake-newsów w prawa obywatelskie.

6. Pandemia COVID-19 a szczepienia przeciwko odrze i innym chorobom zakaźnym

Z obecną sytuacją pandemiczną także wiąże się wiele kwestii spornych i niedomówień związanych z wprowadzeniem na rynek szczepionek różnych firm. Wraz z rozwojem pandemii COVID-19 i pojawieniem się pierwszych z nich rozkwitły ruchy antyszczepionkowe. Głoszone przez nie poglądy dotyczyły m.in. tego, iż szczepimy się niesprawdzonymi preparatami (szczepionka, zbyt szybko powstała i została wprowadzona na rynek), w związku z tym jest eksperymentem medycznym na ludziach związanym ze spiskiem koncernów farmaceutycznych [29]. Ten proces osłabia zaufanie nie tylko do szczepień przeciwko COVID-19, ale również ogólnie do szczepień ochronnych eskalując teorie mówiące o znowiu firm farmaceutycznych w ogóle.

Innym problemem związanym z pandemią jest ograniczenie dostępu do ochornych zdrowia, a w szczególności do szczepień przeciwko innym chorobom [30].

To wszystko stanowi długofalowe zagrożenie dla ochrony przed innymi od SARS-CoV-2 chorobami zakaźnymi jak np. odra, świnka czy gruźlica. Niesie to ryzyko utraty odporności zbiorowej, a tym samym powrót groźnych dla życia i zdrowia infekcji [31].

7. Wnioski

Na podstawie powyższej analizy wielopoziomowej możliwości wystąpienia epidemii odrzy, to zdarzenie wydaje się być coraz bardziej realne. Z roku na rok rosnący odsetek osób niezaszczepionych oraz lawinowy wzrost liczby przypadków zakażenia wirusem odrzy w połączeniu z ruchami antyszczepionkowymi może doprowadzić do utraty odporności zbiorowej w Polsce. Zakażenie wirusem niesie poważne wyzwania terapeutyczne dla szpitali, a komplikacje przechorowania mogą wystąpić nawet po wielu latach.

Konieczne jest położenie nacisku na zwiększenie zaufania obywateli do szczepień ochronnych poprzez reklamę i pozytywną edukację, jak rozpowszechnianie rzetelnych informacji zgodnych z obecną wiedzą medyczną, walka z internetowymi „fake-newsami”, oraz uszczelnienie systemu obowiązkowych szczepień ochronnych dla dzieci.

Jeśli nie podejmie się żadnych działań, może okazać się, iż wieloletni wysiłek włożony w próbę eradykacji chorób zakaźnych okazał się porażką, a straty z tym związane mogą okazać się katastrofalne.



Literatura

1. Adamas M., 8 cytatów Alberta Einsteina, które mają ponadczasowe znaczenie, <https://cytaty.pl/nauka/70357,8-cytatow-alberta-einsteina-ktore-maja-ponadczasowe-znaczenie.html> [data dostępu: 24.02.2022].
2. Biała A., Kołaczowska E., *Przepis na pierwszą w historii szczepionkę: chore bydło, mleczarki i wiejski lekarz. Dlaczego i jak stworzono pierwszą szczepionkę?*, Kosmos problemy nauk biologicznych, tom 68, nr 3, 2019, s. 339-353.
3. Morgan A., Parker J., *Translational mini-review series on vaccines: The Edward Jenner Museum and the history of vaccination*, Clinical and Experimental Immunology, 147, 2007, s. 389-394.
4. <https://www.gov.pl/web/szczepimysie/krotka-historia-szczepionek-jak-na-przestrzeni-dziejow-ratowano-ludzosc> [data dostępu: 24.02.2022].
5. Pardi N., Hogan M.J., Porter F. W., *Weissman mRNA vaccines – a new era in vaccinology*, Nature Reviews Drug Discovery, 17, 2018, s. 261-279.
6. Pająk A., Królak-Olejnik B., *Polski Kalendarz Szczepień Ochronnych – wczoraj, dziś i jutro*, Pielęgniarstwo i Zdrowie Publiczne, 5, nr 1, 2015, s. 93-98.
7. Czajka H., *Dlaczego szczepienia ochronne są nadal potrzebne?*, Developmental Period Medicine, 22, 2018, nr 2, s. 171-178.
8. Nitsch-Osuch A., *Choroby zakaźne – wczoraj, dziś, jutro, Stosunek do szczepień ochronnych: sceptycyzm wobec nauki*, Instytut Problemów Współczesnej Cywilizacji im. Marka Dietricha, 2021.
9. Fita M., Król B., *Obowiązek szczepień ochronnych – analiza prawnomedyczna*, Acta Universitatis Lodzianensis Iuridica, 86, 2019.
10. Szczeklik A., Gajewski P., *Interna Szczeklika*, 11, 2021, Medycyna Praktyczna.
11. Sobczyk W., *Podostre stwardniające zapalenie mózgu*, Polski Przegląd Neurologiczny, 1, 2006, tom 2, s. 1-6.
12. <https://unicef.pl/co-robimy/aktualnosci/dla-mediow/w-2019-liczba-zgonow-na-skutek-odry-wzroslo-o-polowe> [data dostępu: 24.02.2022].
13. <https://www.who.int/health-topics/measles> [data dostępu: 24.02.2022].
14. Dziedzic B., Kobos E., Sienkiewicz E., Leńczuk-Gruba A., Kryczka T., *Increase in cases of measles in Europe*, Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu, 2019, tom 25, nr 4, s. 195-199.
15. <https://szczepienia.pzh.gov.pl/faq/jak-bardzo-zarazliwa-jest-odra/> [data dostępu: 24.02.2022].
16. Mina M.J., Metcalf J., de Swart R., Osterhaus A.D.M.E., Grenfell B., *Long-term measles-induced immunomodulation increases overall childhood infectious disease mortality*, Science, 8, 2015, nr 348.
17. Laksono B.M., de Vries R.D., Verburgh R.J., Visser E.G., de Jong A., Fraaij P.L.A., Ruijs W.L.M., Nieuwenhuijse D.F., van den Ham H.J., Koopmans M.P.G., van Zelm M.C., Osterhaus A.D.M.E., de Swart R.L., *Studies into the mechanism of measles-associated immune suppression during a measles outbreak in the Netherlands*, Nature Communications, 9, 2018, nr 4944.
18. <https://psrp.org.pl/wiesz-wiecej-historia-ruchu-antyszczepionkowego/> [data dostępu: 24.02.2022].
19. Lusawa A., Pinkas J., Zgliczyński W.S., Mazurek M., Wierzbza W., *Nieprawdziwe informacje w zakresie szczepień ochronnych jako wyzwanie dla zdrowia publicznego*, Zdrowie Publiczne i Zarządzanie, 17, 2019, s. 40-45.
20. Sathyanarayana Rao T.S., Andrade C., *The MMR vaccine and autism: Sensation, refutation, retraction, and fraud*, Indian Journal of Psychiatry, 53, 2011, s. 95-96.

21. Mrożek-Budzyn D., Majewska R., Kiełtyka A., Augustyniak M., *Brak związku między ekspozycją na szczepionki zawierające tiomersal i rozwojem autyzmu u dzieci*, Przegląd epidemiologiczny, 65, 2011, s. 491-495.
22. Centrum Badania Opinii Społecznej CBOS, *Opinie na temat szczepień ochronnych dzieci*, Komunikat z badań nr BS/172/2013, Warszawa 2013.
23. Augustynowicz A., Wrześniowska-Wal I., *Aspekty prawne obowiązkowych szczepień ochronnych u dzieci*, Pediatria Polska, 88, 2013, s. 120-126.
24. Wawrzyniak A., Graczyk J., Szost P., Kosińska A., Kalicki B., *Zakażenie wirusem odry jako element diagnostyki i różnicowania z innymi chorobami wirusowymi na podstawie opisu przypadków klinicznych*, Pediatria i Medycyna Rodzinna, 16, 2020, s. 93-99.
25. Szalotka A., *Antagonistyczne postawy wobec szczepień zagrożeniem dla cywilizacji*, E-Wydawnictwo. Prawnicza i Ekonomiczna Biblioteka Cyfrowa. Wydział Prawa, Administracji i Ekonomii Uniwersytetu Wrocławskiego, 2019, s. 311-320.
26. Kocemba P., Lasota M., Sroka N. H., Feleszko W., *Facebook-based medicine, czyli profesjonalny wizerunek lekarza w internecie*, Pediatria i Medycyna Rodzinna, 11, nr 3, 2015, s. 328-338.
27. Mamak K., *Karalność medycznych fake newsów*, Filozofia w Praktyce, 2020, tom 6.
28. Mello M.M., Studdert D.M., Parmet W.E., *Shifting Vaccination Politics – The End of Personal-Belief Exemptions in California*, England Journal of Medicine, 373, 2015, s. 785-787.
29. Kozik E., *Jak troszczyć się o życie? Antyszczepionkowe narracje spiskowe w czasie pandemii COVID-19*, Studia Etnologiczne i Antropologiczne, tom 21, 2021.
30. Barczewski M., Sykuna S., *Pandemia COVID-19: wielopłaszczyznowość problemu dostępu do szczepionek i innych produktów leczniczych na tle filozofii prawa własności intelektualnej*, Ruch Prawniczy, Ekonomiczny i Socjologiczny, tom 82, nr 3, 2020.
31. Słopiecka A., Kwiecień E., *Przyczyny negatywnych postaw ludności wobec szczepień*, Hygeia Public Health, 49, nr 4, 2014, s. 685-689.

Epidemia odry (ang. *rubeola*) jako realne zagrożenie – analiza problemu spadku liczby szczepień przeciwko chorobom zakaźnym

Streszczenie

Kalendarz szczepień, czyli wykaz zalecanych i obowiązkowych szczepień dla dzieci jest niebывałym osiągnięciem cywilizacyjnym. Liczne badania potwierdzają ten fakt. Na ten przykład ospa prawdziwa (łac. *variola vera*), została uznana przez WHO za eradykowaną, czyli wyeliminowaną z populacji ludzkiej w 1980 roku dzięki szczepionce przeciwko tej chorobie. Wysoka wyszczepialność przeciwko takim chorobom jak: świnka, różyczka czy odra niejako osłabiło czujność lekarzy oraz osób czuwających nad bezpieczeństwem epidemiologicznym w kraju, gdyż choroby te przestały praktycznie występować wśród ludzi. Obserwowany od wielu lat spadek liczby szczepień przeciwko chorobom zakaźnym powoduje, iż coraz częściej zdarzają się przypadki np. odry. Jest to ogromne zagrożenie, jak i regres cywilizacyjny, który udało się osiągnąć dzięki odporności zbiorowej i wysokim odsetkom osób zaszczepionych. Istnieje wiele niebezpiecznych skutków powrotu chorób, których niewiele lekarzy miało szansę zobaczyć w praktyce klinicznej. Także studenci medycyny praktycznie nigdy nie mieli okazji zobaczyć chorób takich jak odra czy błonica, a ich wiedza o tej chorobie pochodzi tylko z podręcznika. Z jednej strony powrót zapomnianych już chorób zakaźnych może spowodować wystąpienie nowych epidemii, gdyż zakaźność np. odry jest kilkukrotnie wyższa niż wirusa SARS-CoV-2, natomiast z drugiej strony może zabraknąć osób, które będą stawiać diagnozę tej choroby, jak i leków, którymi będzie można je leczyć. W wystąpieniu podjęto próbę przyjrzenia się szczepieniom przeciwko odrze i obserwowanym wzroście przypadków tej choroby na świecie. Wzrost ruchów antyszczepionkowych, szczególnie w czasach pandemii COVID-19 miał niebывały wpływ na postrzeganie wszystkich szczepionek, nie tylko tych przeciwko wirusowi SARS-CoV-2. Uwzględnienie tego czynnika w pracy jest prawdopodobnie jednym z głównych przyczyn wzrostu liczby zachorowań na odrę. Poruszony problem wydaje się być istotny nie tylko ze względów medycznych, ale także ekonomicznych, wszak lepiej zapobiegać niż leczyć.

Słowa kluczowe: odra, epidemia, antyszczepionkowcy, szczepienia, choroby zakaźne

The measles epidemic (Rubeola) as a real threat – analysis of the problem of the decline in vaccinations against infectious diseases

Abstract

The vaccination calendar, the list of recommended and compulsory vaccinations for children, is an extraordinary achievement of civilization. Numerous studies confirm this. Smallpox (variola vera) was classified by the WHO in 1980 as eradicated, i.e. eliminated from the human population, thanks to a vaccine against the disease. The high level of immunity against diseases such as mumps, rubella or measles has weakened the vigilance of doctors and those responsible for epidemiological security in the country, as these diseases are practically eliminated among humans. The decline in vaccination against infectious diseases, which has been observed for many years, is leading to an increasing incidence of cases such as measles. This is a major threat and a regression in civilisation achieved by collective immunity and the high proportion of people vaccinated. There are many dangerous effects of the return of diseases that few doctors in clinical practice have been able to see. Medical students have almost never had the opportunity to see diseases such as measles or diphtheria, and their knowledge about this disease comes only from textbooks. On the one hand, the re-emergence of forgotten infectious diseases may lead to new epidemics, e.g. as measles is many times higher than the SARS-CoV-2 virus, on the other hand, there may be a lack of people to diagnose the disease and of medicines to treat it. This speech attempted to investigate measles vaccination and the worldwide increase in measles. The increase in anti-vaccine movements, particularly during the COVID-19 pandemic, had a huge impact on the perception of all vaccines, not just those against SARS-CoV-2 virus. Taking this factor into account at work is probably one of the main reasons for the increase in measles. The problem seems to be important not only for medical reasons but also for economic ones, but prevention is better than cure.

Keywords: measles, epidemic, anti-vaccines, vaccinations, infectious diseases

E-papierosy – wpływ na układ odpornościowy, ryzyko infekcji i odpowiedź poszczepienną

1. Wstęp

W ostatnim czasie opublikowane zostały wyniki badań, wskazujące na to, że elektroniczne papierosy (tzw. e-papierosy) – powszechnie uznane za bezpieczniejszą formę palenia tytoniu – mogą mieć niekorzystny wpływ na zdrowie. Rozpatrzenie tematu wpływu e-papierosów na organizm poprzez podjęcie go w szerszej perspektywie może pomóc w lepszym zrozumieniu mechanizmów, w tym tych niepożądanych, których lepsze poznanie może być istotne z punktu widzenia zdrowia publicznego.

2. Cel publikacji

Celem pracy jest omówienie tematu dotyczącego wpływu e-papierosów na układ odpornościowy, ryzyko infekcji i odpowiedź poszczepienną, z uwzględnieniem najnowszych doniesień naukowych.

3. Metodologia

Praca na charakter przeglądy. Przegląd piśmiennictwa naukowego został dokonany z zastosowaniem bazy PubMed NCBI (*National Centre of Biotechnological Information*) oraz innych źródeł i materiałów, związanych z tematem pracy w sposób pośredni lub bezpośredni. W celu wyodrębnienia wszystkich publikacji, dotyczących tematu pracy, wybrane źródła zostały wyłonione w oparciu o zastosowanie słów i haseł kluczowych takich jak: e-cigarette oraz kombinacje e-cigarette AND history, e-cigarette AND intestine, e-cigarette AND elastase, e-cigarette AND MMP-9, e-cigarette AND respiratory tract AMD protein, e-cigarette AND neutrophil, e-cigarette AND vaccine response, e-cigarette AND antioxidant. W oparciu o tę metodologię, wyodrębniono badania doświadczalne i kliniczne, których wyniki były publikowane w latach 2018-2022 celem dokonania przeglądu i syntezy wniosków.

4. E-papierosy – definicja

Papierosy elektroniczne są to urządzenia odparowujące roztwór nikotyny połączony z płynnymi aromatami. W tradycyjnych papierosach spalane są liście tytoniu. Od chwili pojawienia się na rynku e-papierosów w 2004 r. ich sprzedaż i użycie gwałtownie wzrosło. E-papierosy są propagowane jako zdrowsza, tańsza i bardziej akceptowalna w społeczeństwie alternatywa dla tradycyjnych papierosów. Pierwotnie e-papierosy miały kształt wyrobów tytoniowych np. papierosów czy cygar. Aktualnie zaś e-papierosy produkowane są w rozmaitych formach przedmiotów używanych na co dzień, np. w formie długopisów czy nośników pamięci USB [1].

¹ Wydział Medyczny. Collegium Medicum, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie

² Wydział Prawa i Administracji, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie.

³ Wydział Medyczny. Collegium Medicum, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie.

Technologia, którą wykorzystuje się do produkcji elektronicznych papierosów, gwałtownie się rozwinęła w ciągu ostatnich 10 lat jako metoda dostarczania nikotyny do organizmu. Z punktu widzenia zdrowia publicznego i klinicznego wpływ e-papierosów jest wciąż kwestią dyskusyjną, poruszaną ze względu na konieczność zrównoważenia możliwych negatywnych skutków zdrowotnych produktu z potencjalną redukcją szkód, jeśli okazałoby się, że e-papierosy przynoszą pozytywne skutki, w tym np. zaprzestanie palenia papierosów tradycyjnych [2].

Papierosy elektroniczne w Polsce podlegają wielu regulacjom prawnym zgodnie z ustawą z dnia 22 lipca 2016 r. o zmianie ustawy o ochronie zdrowia przed następstwami używania tytoniu i wyrobów tytoniowych (Dz.U. 2016 poz. 1331). E-papierosy mogą nabyć wyłącznie osoby pełnoletnie – tj. te, które ukończyły 18. rok życia. Ustawodawca określa również wymagania jakie powinien spełniać e-papieros, m. in. maksymalną możliwą zawartość nikotyny oraz podkreśla iż oprócz nikotyny w e-papierosach mogą znajdować się tylko takie składniki, które w postaci podgrzanej lub nie podgrzanej nie zagrażają zdrowiu ludzkiemu. Przepisy wskazują również na niemożność palenia e-papierosów w miejscach do tego niewyznaczonych [3].

5. E-papierosy – historia, rodzaje, mechanizm działania

5.1. E-papierosy – historia

Pierwsza idea stworzenia e-papierosa powstała w 1963 r. podczas gdy Herbert A. Gilbert zarejestrował patent na „bezdymnego papierosa bez tytoniu”. Celem tego przedmiotu miało być zagwarantowanie bezpiecznego sposobu palenia tytoniu poprzez zamianę palącego się tytoniu na podgrzane, wilgotne, aromatyzowane powietrze. Czterdzieści lat po tym odkryciu, w 2003 r. chiński farmaceuta Hon Lik, został wynalazcą e-papierosów w aktualnej ich formie. Od tamtego momentu elektroniczne papierosy uległy dużej popularyzacji na całym świecie i ich użycie znacznie wzrosło [1].

5.2. E-papierosy – rodzaje

Na świecie istnieje ponad 460 marek produkujących elektroniczne papierosy, tysiące różnych e-liguidów. Produkowane e-papierosy różnią się m.in. stężeniem nikotyny, ilością odparowywanej nikotyny czy topografią palenia e-papierosów, tj. głębokością i szybkością zaciągania, czasem przerw między zaciągnięciami i ilością zaciągnięć. [5]. Firmy, produkujące papierosy elektroniczne, rozróżniają sześć rodzajów e-papierosów, mianowicie:

- akumulatorowy zestaw startowy e-papierosy cigalike – przeznaczony dla nowych użytkowników papierosów elektronicznych, jest łatwy w użyciu oraz przeznaczony dla dorosłych chcących rzucić palenie tradycyjnych papierosów;
- zestawy vape w stylu pióra – jest przeznaczony dla bardziej doświadczonych vaperów;
- zestawy pod – zestaw Pod Kit ma taki sam sposób działania jak papieros, lecz nie ma jego kształtu;
- zestawy podomarów – zestawy sub-omowe są przeznaczone do bardziej zaawansowanych oparów, gdyż przy tej metodzie wapowania tworzone są duże chmury opadów;
- e-papierosy jednorazowe – wystarcza on od 1 do 3 dni, zależnie od częstotliwości i długości wapowania;
- e-papierosy z możliwością ładowania – jest to produkt do wapowania z ładowarką USB, który trzeba odłączyć, gdy zaświeci się odpowiednia kontrolka [6].

5.3. E-papierosy – mechanizm działania

E-papierosy złożone są z trzech głównych elementów, mieszczących się w obudowie ze stali nierdzewnej: kartidża, atomizera i baterii. Wkład służy do przechowywania płynnej mieszanki, która składa się zazwyczaj z glikolu propylenowego i/lub gliceryny roślinnej, wody i aromatów. Ta mieszanina może zawierać nikotynę o różnych stężeniach lub być jej pozbawiona. Kiedy osoba, która pali e-papierosa, wykonuje wdech przez ustnik, obwód wrażliwy na nacisk uruchamia atomizer, ten zaś podgrzewa płyn umieszczony w kartridżu, tworząc opary przypominające dym [1].

Nikotyna, zawarta w e-papierosach, najprawdopodobniej jest wchłaniana przez nabłonek górnych dróg oddechowych lub miąższ płuc, gdyż są one w bezpośredniej styczności z aerozolem. Istnieją e-papierosy nieposiadające nikotyny w swoim składzie, lub zawierające ją w małych ilościach. W zależności od typów grzałek poziom nikotyny może być różny we wkładzie i w aerozolu [5].

5.4. E-papierosy – dane dotyczące rozpowszechnienia

W 2020 r. Rzecznik Praw Dziecka zlecił Instytutowi Badań Pollster przeprowadzenie badań wśród młodych ludzi dotyczących używania papierosów elektronicznych. Wyniki badań wskazują, iż aż 23% osób w wieku 16-19 lat pali e-papierosy. Okazuje się, że wśród nastolatków dostęp do e-papierosów nie stanowi żadnego problemu, a wręcz przeciwnie – są one wszechobecne. Z badań wynika, że polska młodzież zaczyna obcowanie z e-papierosami głównie w ramach rozrywki – dotyczy to 58% badanych, lub traktuje wapowanie jako przerwę w nauce – 43%; jednym z głównych powodów sięgania po e-papierosy jest również stres – dotyczy to 47% użytkowników. Badania wśród młodzieży zostały także przeprowadzone w kontekście wiedzy młodych osób o papierosach elektronicznych. 51 % badanych przyznaje, że posiada niewielką wiedzę nt. e-papierosów, lecz uważa, że ta wiedza jest dostateczna, 20% zaś twierdzi, że ich wiedza jest zadowalająca, a tylko 18% chciałoby poszerzyć swoją wiedzę na ten temat. Rzecznik Praw Dziecka – Mikołaj Pawlak wysnuł z tych badań wnioski, iż należy spowolnić rozpowszechnianie się tego rodzaju zgubnej przyjemności. Zapewnił on również, że podejmie odpowiednie działania profilaktyczne w tym celu, za pośrednictwem szkół, aby polska młodzież zaczęła zdawać sobie sprawę z tego, jak wielkie niebezpieczeństwo niesie za sobą używanie papierosów elektronicznych [7].

6. E-papierosy – wpływ na zdrowie

6.1. Wpływ e-papierosów na florę bakteryjną jelit

Mikrobiota jelitowa jest niezwykle istotna dla wielu procesów np. trawienia, wchłaniania, metabolizmu, ale też odgrywa rolę w budowaniu odporności. Skład ilościowy i jakościowy jest zróżnicowany i zależy od odcinka układu pokarmowego. Sugerowana liczebność w gramie treści jelita grubego wynosi około 10^{12} komórek, łączna liczba gatunków sięga 800-900 bakterii i archeonów [8].

Coraz częściej prowadzone są badania nad mikrobiomem jelit; wykazały one m.in., że a palenie tytoniu ma na ten mikrobiom wpływ. Okazuje się, że u palaczy papierosów tradycyjnych wykazano większą obfitość *Prevotella*, zaś niższą – *Bacteroides* oraz mniejszą różnorodność *Shannona*, w porównaniu z grupą kontrolną składającą się z osób niepalących. Zaprzestanie palenia papierosów spowodowało wzrost różnorodności drobnoustrojów i głębokie zmiany w mikrobiomie jelitowym, dotyczące między

innymi bakterii z rodzaju *Bacteroidetes* i *Proteobacteria*. Wyniki badań wskazują na to, że u palaczy papierosów tradycyjnych dochodzi do zmiany w liczebności alfa-proteobakterii i betaproteobakterii oraz do wzrostu liczebności *Firmicutes* i *Actinobacteria*. Dodatkowo przeprowadzono badanie porównujące zmiany profilu bakteryjnego u palaczy papierosów tradycyjnych oraz e-papierosów. Wyniki wskazują, że palenie papierosów tradycyjnych wywoływało bardziej znaczące zmiany w mikrobiomie jelit, niż palenie e-papierosów; zmiany te dotyczą w szczególności względnego wzrostu obfitości *Prevotella* czy zmniejszeniem liczebności *Bacteroides*. Nie stwierdzono istotnych różnic w różnorodności alfa-proteobakterii i betaproteobakterii lub względnej liczebności taksonomicznej pomiędzy palaczami e-papierosów a grupą kontrolną, złożoną z osób niepalących [9].

Wpływ aerozolu e-papierosów na stan okrężnicy oceniany był w badaniach eksperymentalnych. W badaniu użyto łącznie 30 dorosłych samców myszy. Zwierzęta były podzielone na trzy grupy. Pierwsza grupa była kontrolną, druga była badana bezpośrednio po 4-tygodniowym narażeniu na opary, a trzecia była obserwowana 4 tygodnie po tym jak zaprzestano narażać ją na opary przez 4 tygodnie. U myszy narażonych na opary elektronicznych papierosów stężenie aldehydu malonowego i ilość całkowitego tlenu azotu wzrosła w sposób znaczący w tkance okrężnicy, a stężenie dysmutazy ponadtlenkowej – enzymu ważnego w ochronie antyoksydacyjnej komórek – uległo zmniejszeniu. W badaniach histologicznych okrężnicy zwierząt poddanych ekspozycji na opary e-papierosów (zawierające w swoim składzie również nikotynę) zaobserwowano, że jej błona śluzowa była zniekształcona, wyściółka nabłonkowa została utracona, pojawił się naciek komórek zapalnych. Znacząco wzrosła ekspresja czynnika martwicy nowotworów (ang. *tumor necrosis factor α* , TNF- α). Po 4 tygodnia od zakończenia ekspozycji na opary zaobserwowano spadek immunosupresji, spadek produkcji TNF- α , równowaga utleniająco-antyoksydacyjnej została przywrócona, a błona śluzowa powróciła do stanu prawidłowego. Okazuje się zatem, że stosowanie elektronicznych papierosów powoduje wyraźne patologiczne zmiany w obrębie błony śluzowej okrężnicy. Zaprzestanie ekspozycji prowadzi do poprawy stanu okrężnicy i częściowo do przywrócenia integralności jej błony śluzowej.

Potrzebne są dalsze badania, aby poznać krótko- i długotrwałe skutki używania e-papierosów [10]. Warto zaznaczyć, że niektóre badania wskazują, że palenie może zmieniać nie tylko mikrobom jelitowy, ale doprowadzać do zmian przykładowo w górnym odcinku przewodu pokarmowego, ślinie czy gardle [9].

6.2. Wpływ na procesy zapalne

W wielu badaniach zidentyfikowano znaczącą ilość rozmaitych substancji chemicznych występujących w oparach e-papierosów, które mogą być toksyczne i wpływać na procesy zapalne. Istotny może być fakt, iż poziomy kilku z tych substancji toksycznych wzrosły po odparowaniu z powodu ciepła i/lub napięcia wytwarzanego przez baterię w e-papierosach. Wykazano, że nikotyna, zawarta w oparach e-papierosów, zwiększa produkcję reaktywnych form tlenu w komórkach nabłonka oddechowego, jak również w makrofagach pecherzykowych; wolnorodnikowe uszkodzenie komórek pośrednio może się przyczyniać do rozwoju stanu zapalnego. Zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu, zapalnych cytokin i chemokin, wywoływana narażeniem na opary e-papierosów, może wywołać stan zapalny w makrofagach pęcherzykowych w płucach,



który jest częściowo zależny od nikotyny. W warunkach *in vivo* stwierdzono też wpływ narażenia na opary e-papierosów na upośledzenie zdolności fagocytarnej makrofagów, która jest istotna dla prawidłowego funkcjonowania wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Upośledzenie tego mechanizmu było prawdopodobnie uwarunkowane przez opary e-papierosa [11]. Badania pokazują także, że waporyzacja nasila cytotoksyczne działanie e-papierosów indukując zarówno apoptozę, jak i martwicę komórek nabłonka oddechowego. E-papieros z kondensatem pary z e-papierosów jest bardziej toksyczny dla makrofagów pęcherzykowych niż e-papierosy bez wapowania (*waping* – wdychanie aerozolu powstającego wskutek podgrzania liquidu, zawierającego nikotynę, rozpuszczalniki, np. glikol propylenowy i gliceryna roślinna oraz aromaty).

6.3. Wpływ e-papierosów na profil białek uczestniczących w mechanizmach odpornościowych w wydzielinie dróg oddechowych, w tym elastazy i MMP-9

Proteoliza jest kluczowa dla wrodzonej odporności człowieka. Proteazy takie jak elastaza neutrofilowa czy metaloproteazy macierzy pozakomórkowej (ang. *matrix metalloproteinases*, MMPs) modulują sygnalizację komórkową, wpływają na stan zapalny, przebudowę tkanek. Wpływają też na rekrutację leukocytów np. przez rozszczepienie nieaktywnych form czynników transkrypcyjnych i indukcję syntezy docelowych białek w tym cytokin czy chemokin. W przypadku przewlekłego używania tytoniu dochodzi do nadmiernej proteolizy, a w konsekwencji do rozstrzenia oskrzeli i rozedmy płuc. Jedno z badań obejmowało palaczy tradycyjnych papierosów, e-papierosów oraz osoby niepalące. Równolegle przeprowadzono badanie na izolowanych neutrofilach krwi obwodowej i makrofagach popłuczyn oskrzelowo-płucnych. Analizie poddano też stężenie nikotyny w płwocinie indukowanej i w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych (ang. *bronchoalveolar lavage*, BAL). Wyniki tych badań doprowadziły do wniosku, że z punktu widzenia wpływu na produkcję MMPs wapowanie może nie być bardziej bezpieczne niż palenie tytoniu [12].

Przeprowadzono również badania dotyczące składu indukowanej płwociny palaczy tradycyjnych papierosów, e-papierosów i osób niepalących. Zastosowano proteomikę ilościową, technikę rozpraszania światła/refraktometrię oraz znakowaną spektrometrię mas. W porównaniu z osobami niepalącymi – w płwocinie osób palących papierosy tradycyjne odnotowano wzrost detoksykacji aldehydowej i białkowej, co miało związek ze stresem oksydacyjnym. Podwyższona była też ilość białek trawiących składowe macierzy pozakomórkowej jak MMP-9 czy elastazy. Warte uwagi jest to, że są to białka związane z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc. W porównaniu do składu indukowanej płwociny osób niepalących – w płwocinie indukowanej u palaczy e-papierosów stwierdzono zmiany stężenia 81 białek. Dla porównania w indukowanej płwocinie palaczy tradycyjnych papierosów odnotowano zmiany stężenia 44 białek. Zmiany dotyczyły m.in. białek wchodzących w skład śluzu dróg oddechowych. W porównaniu z palaczami papierosów tradycyjnych – w indukowanej płwocinie palaczy elektronicznych papierosów nie wykazano wyższego stężenia białek pełniących rolę w mechanizmach obronnych błony śluzowej. Przykładem takich białek są: laktoferyna, czynnik trójlistny 3, lizozym C. Natomiast stężenie kilku białek odporności wrodzonej np. DMBT1 (ang. *deleted in malignant brain tumors 1*, DMBT1) i lizozym C (ang. *lysozyme C*, LYSC) był znacząco obniżony u użytkowników e-papierosów w porównaniu z osobami niepalącymi [13].

Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe palaczy papierosów tradycyjnych i waperów wykazują zwiększone stężenia elastazy neutrofilowej (ang. *neutrophilic elastase*, NE) i MMP (MMP-2 i MMP-9) – w porównaniu z popłuczynami pochodzącymi od osób niepalących. Nie zmienia się natomiast stężenie inhibitorów proteaz. Interpretując te obserwacje trzeba wziąć pod uwagę fakt, że palacze e-papierosów mogli wcześniej być palaczami tradycyjnych wyrobów tytoniowych, a wykazane zmiany mogłyby wtedy nie być związane z oparami e-papierosów, ale być konsekwencją wcześniejszego działania tytoniu. We wspomnianym badaniu pięciu na czternastu waperów zgłosiło, że zanim zaczęli korzystać z e-papierosów, nie palili wcześniej tytoniu. W tej grupie stężenie wszystkich trzech proteaz: NE, MMP-2, MMP-9 było znacząco podwyższone w porównaniu ze stężeniem tych białek u osób niepalących. Zatem wyniki te wskazują, że wzrost poziomu proteaz w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych ma związek z wapowaniem, a nie z wcześniejszą ekspozycją na tytoń. Dodatkowo na podstawie badań stężenia nikotyny w indukowanej płwocinie i BAL oraz oceny liczby neutrofilii i makrofagów można wnioskować, że podwyższony poziom proteaz nie ma związku ani z podwyższoną liczbą neutrofilii, ani makrofagów. Wyizolowane neutrofile poddano działaniu e-liquidu. Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że nikotyna indukuje wydzielanie proteazy w ludzkich neutrofilach i makrofagach *in vitro* (szerszy opis tych procesów zawarto w następnym podrozdziale) [12].

Sayed i wsp. oceniali fenotyp zapalny u palaczy e-papierosów oraz zmiany, jakie następują, gdy dochodzi do zaprzestania palenia. Badano również funkcjonowanie monocytów. W próbkach palaczy e-papierosów obserwowana była tendencja do zmniejszenia poziomu białek immunomodulujących – w porównaniu z grupą kontrolną, złożoną z osób niepalących. Poziomy cytokin, chemokin i czynników wzrostu w krwi obwodowej były zwykle podwyższone. Zaobserwowano zmiany w fenotypie zapalnym monocytów w odpowiedzi na ograniczenie stosowania e-papierosów – wytwarzały one mniej IL-8 i IL-6 po prowokacji lipopolisacharydem bakteryjnym – może to sugerować ich zmniejszoną zdolność do prawidłowej reakcji na infekcję bakteryjną [14].

Reidel i wsp. zaobserwowali, że palenie papierosów tradycyjnych i progresja przewlekłej obturacyjnej choroby płuc koreluje ze zwiększonym całkowitym stężeniem mucyny oraz zmienionym stosunkiem głównych żelotwórczych mucyn (mucyna 5B, ang. mucin 5B, MUC5B i mucyna 5AC, ang. mucin 5AC, MUC5AC) w płwocinie. Palenie papierosów tradycyjnych było związane z podwyższonym stężeniem mucyny w płwocinie – w porównaniu ze stężeniem u osób niepalących – obserwacja ta nie dotyczyła palaczy e-papierosów. W badaniach, dotyczących stężeń poszczególnych mucyn w płwocinie, odnotowano istotny wzrost stężenia MUC5AC – zarówno u palaczy papierosów tradycyjnych, jak też elektronicznych – w obu tych grupach miało to wpływ na istotny wzrost stosunku MUC5AC/MUC5B, w porównaniu z wartościami odnotowanymi u osób niepalących [13].

Okazuje się zatem, że e-papierosy wpływają na profil białek uczestniczących w mechanizmach odpornościowych dróg oddechowych, takich jak np. elastazy czy MMP-9.

6.4. Wpływ na profil białek biorących udział w ochronie antyoksydacyjnej

Aerozole e-papierosów zawierają kilka potencjalnie toksycznych substancji, które mogą wywoływać stres oksydacyjny. Mogą też wpływać na zmiany ekspresji genów komórek nabłonka oskrzeli podobne do tych, które wywołuje dym tytoniowy. Przeprowadzono badanie, którego celem było określenie genotoksyczności i mechanizmów indukowanych przez ekstrakty aerozolowe e-papierosów w ludzkich komórkach nabłonka jamy ustnej i płuc. Narażano komórki na działanie ekstraktu aerozolowego e-papierosów lub głównych ekstraktów dymu papierosów tradycyjnych. Okazało się, że ekstrakty aerozolowe e-papierosów indukowały uszkodzenia DNA zależnie od dawki, ale niezależnie od stężenia nikotyny. Indukowały one znacznie mniej uszkodzeń DNA niż ekstrakty z dymu papierosów tradycyjnych.

Natomiast poziomy oksydacyjnego uszkodzenia DNA były podobne lub nieco wyższe w komórkach poddanych działaniu ekstraktów aerozolowych elektronicznych papierosów i w komórkach, na które oddziaływały ekstraktami z dymu tradycyjnych papierosów. Ekspozycja na aerozol z e-papierosów znacznie zwiększała ilość reaktywnych form tlenu (czego nie obserwowano po ekspozycji na dym z papierosów tradycyjnych). Wskazywała na to obecność 8-oxo-dG – markera oksydacyjnego uszkodzenia DNA. W przypadku ekspozycji na aerozol e-papierosów dochodziło też do zmniejszenia całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (ang. *total antioxidant capacity*, TAC) i ekspresji glikozydazy DNA 8-oksoguaniny (ang. *8-oxoguanine-DNA glycosylase*, OGG1), która jest enzymem niezbędnym do usuwania oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Wyniki badań wskazują, że e-papierosy sprzyjają tłumieniu komórkowych mechanizmów obronnych przeciwutleniających i prowadzą do uszkodzenia DNA. To odkrycie wydaje się istotnym punktem wyjścia do dalszych badań. Istnieje pilna potrzeba zbadania długoterminowego ryzyka jakie może nieść ze sobą narażania organizmu na działanie aerozolu e-papierosów [15].

Pouliani i wsp. oceniali reakcje przeciwutleniające po aktywnym i biernym paleniu tytoniu lub ekspozycji (czynnej lub biernej) na opary papierosów elektronicznych z uwzględnieniem wpływu na wybrane markery stanu redoks. Oceniano TAC, aktywność katalazy (ang. *catalase*, CAT) i stężenie zredukowanego glutationu (ang. *reduced glutathione*, GSH) w krwi obwodowej uczestników badania przed i po jednogodzinnej ekspozycji. Nie odnotowano zmian w zakresie wartości badanych parametrów po ekspozycji zarówno na palenie tytoniu, jak i e-papierosów. Zatem narażenie na palenie tytoniu i e-papierosów nie zmienia w ostry sposób reakcji układu antyoksydacyjnego (ani w warunkach aktywnego, ani w warunkach biernego palenia) [16].

W badaniu na szczurach doświadczalnych (przytaczanym w poprzednim podrozdziale) wyniki badań biochemicznych wskazywały m.in. na stres oksydacyjny indukowany narażeniem na dym e-papierosów. W grupie narażonej na opary e-papierosów nastąpił znaczny spadek stężenia dysmutazy nadtlenkowej (ang. *superoxide dismutase*, SOD) oraz wzrost poziomów dialdehydu malonowego (ang. *malondialdehyde*, MDA) i tlenku azotu (ang. *nitric oxide*, NO) w tkance okrężnicy, w porównaniu grupą kontrolną. To może być wyjaśnieniem indukowanej przez narażenie na opary e-papierosów patologii przewodu pokarmowego związanej z narażeniem na opary e-papierosów. Stres oksydacyjny może pogarszać stan bariery przewodu pokarmowego i powodować wzrost przepuszczalności jelit. Prowadzić to może również do stanu zapalnego. Jednak



w badaniu po 4 tygodniach od zaprzestania używania e-papierosów równowaga utleniająco-antyoksydacyjna została przywrócona.

Zatem stosowanie elektronicznych papierosów może wpływać na stres oksydacyjny i zapalenie, co może powodować zmiany w błonie śluzowej okrężnicy o charakterze patologicznym [10].

6.5. Wpływ na funkcje neutrofilii

Neutrofile są najliczniejszymi granulocytami. Część może być obecna w krwi obwodowej, a część może pozostawać w kontakcie ze śródbłonkiem stanowiąc pulę marginalną. Ich czas przeżycia po opuszczeniu krwi i migracji do tkanek wynosi ok. 5 dni [17].

W jednym z badań na skutek narażenia na oddziaływanie ekstraktu oparów z e-papierosa odnotowano zmiany kształtu neutrofilii izolowanych z krwi obwodowej utrzymywanych w hodowli komórkowej oraz wzrost ekspresji na tych komórkach cząsteczek CD11b i CD66b, a także wzrost wydzielania MMP-9 i CXCL8. Wykazano dodatni związek między stężeniem MMP-9, liczbą neutrofilii w indukowanej płwocinie a nasileniem przewlekłej obturacyjnej choroby płuc, która czasem jest nazywana „neutrofilową chorobą płuc”. Dym e-papierosa indukował aktywację szlaku sygnalizacji komórkowej i szybką aktywację neutrofilii. W niektórych markach elektronicznych papierosów obecna jest w znacznych ilościach akroleina (zaobserwowano ją w dymie, a nie w e-liquidzie). Wykazano, że wpływa ona na odpowiedź zapalną neutrofilii i wzrost uwalniania MMP-9 przez te komórki [18].

Reidel i wsp. wykazali znaczny wzrost stężenia białek związanych z granulocytami oraz z pozakomórkowymi pułapkami neutrofilii (ang. neutrophil extracellular traps, NET) takimi jak mieloperoksydaza, azurocydyna czy deiminaza białkowo-argininowa w indukowanej płwocinie waperów, w porównaniu z osobami niepalącymi lub palącymi papierosy tradycyjne. Poziom tych białek był znacząco podwyższony pomimo tego, że nie odnotowano w tej grupie znaczącego wzrostu liczby neutrofilii. NET związane są ze specyficznym rodzajem śmierci komórki jaką jest NEToza i składają się z włókien chromatyny, elastazy neutrofilowej (NE) i mieloperoksydazy (MPO), które z kolei mają związek ze stanem zapalnym oskrzeli czy uszkodzeniami strukturalnymi w mukowiscydozie i przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc [13]. Podczas NETozy (NETosis) neutrofile uwalniają pozakomórkowe pułapki neutrofilii (NET). Takie rozwiązania pozwala wychwytywać bakterie czy inne patogeny, aby zapobiec ich rozprzestrzenianiu [19].

Dodatkowo wykazano, że ekspozycja na opary e-papierosów doprowadza do zmniejszonej zdolności reagowania neutrofilii i polaryzacji w kierunku chemoatraktantów, aktywacji szlaku sygnałowego p38 MAPK oraz niezdolności do złożenia oksydazy NADPH. W wyniku tego neutrofile wykazują zaburzoną chemotaksję, a także osłabioną zdolność fagocytarną [20].

6.6. Wpływ na podatność na ryzyko i przebieg infekcji wirusowych i bakteryjnych oraz na odpowiedź poszczepienną

Jak wynika z przytoczonych wyników badań składniki płynu, zawartego w e-papierosach, wpływają na nasilenie stanu zapalnego, a jednocześnie upośledzają funkcjonowanie mechanizmów odporności wrodzonej i nabytej, w tym między innymi osłabiają

aktywność fagocytarną, chemotaksję neutrofilów oraz obniżają produkcję reaktywnych form tlenu ważnych dla mechanizmów obronnych. To może przekładać się na zwiększoną podatność na infekcje bakteryjne i wirusowe w pierwotnych komórkach dróg oddechowych. Sprzyjają temu zmiany w ekspresji cytokin ze spadkiem stężenia cytokin ważnych w odporności przeciwwirusowej.

Na odpowiedź immunologiczną poprzez tłumienie jej możliwości obronnych wpływa według badań *in vitro* diacetyl (DA), będący nie tylko aromatem dodawanym do popcornu, ale też stosowanym w e-papierosach. Jest to alfa-diketon, którego działanie doprowadza do utraty rzęsek w drogach oddechowych, zwiększonej produkcji hialuronianu. Wykazano, że po zakażeniu wirusem SARS-CoV-2 w oparach DA w porównaniu z nabłonkiem oskrzeli nienarażonym na opary był obecny zarówno genomowy, jak i subgenomiczny RNA SARS-CoV-2. Można zatem przypuszczać, że zmiany transkryptyomiczne i fizjologiczne wywołane ekspozycją na opary diacetylu uszkadzają rzęski w drogach oddechowych i zwiększają podatność gospodarza na infekcję wirusową SARS-CoV-2 [22].

6.7. Wpływ na odpowiedź poszczepienną

Biorąc pod uwagę fakt, że e-papierosy wywołują zmiany prowadzące do obniżenia odporności i zwiększenia podatności na infekcję wirusową można postawić sobie pytanie jaki wpływ wywiera wapowanie na odpowiedź poszczepienną. Taki temat został podjęty przez badaczy w odniesieniu do szczepienia na grypę. W badaniu osoby niepalące, palące tytoń tradycyjny oraz palące e-papierosy zostały zaszczepione żywym atenuowanym wirusem grypy (ang. *live attenuated influenza vaccine*, LAIV). Przed i po inokulacji zebrano od uczestników badania płyn nabłonkowy nosa, płyn z płukania nosa, próbki biopsji z nosa, moczu oraz krwi. Odnotowano wzrost poziomu immunoglobuliny A (ang. *immunoglobulin-A*, IgA) w płynie z płukania nosa u osób niepalących – podobnego wzrostu nie zaobserwowano u palaczy (zarówno papierosów tradycyjnych, jak i elektronicznych). W próbkach biopsyjnych z nosa stężenie chemokin: białko chemoatraktantu monocytów 1 (ang. *monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1, białko zapalne 1 β (ang. *macrophage inflammatory protein*, MIP-1 β) było wyższe u waperów w porównaniu z osobami niepalącymi. Z kolei poziom cytokin regulujących obronę odpowiedź przeciwwirusową: interferon gamma (ang. *interferon gamma*, IFN γ), IL-6, interleukina-12p40 (ang. *interleukin-12p40*, IL-12p40) był niższy u waperów w porównaniu z osobami niepalącymi (podobnego efektu nie odnotowano u palaczy tradycyjnych papierosów). Ciekawe jest, że poziomy interleukiny-2 (ang. *interleukin-2*, IL-2), interleukiny-1 α (ang. *interleukin-1 α* , IL-1 α) i czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) po szczepieniu LAIV były podwyższone u palaczy elektronicznych papierosów w porównaniu z osobami niepalącymi.

Przedstawione dane sugerują, że stosowanie e-papierosów może wiązać się z większym ryzykiem wirusowych infekcji dróg oddechowych oraz ze zmienioną odpowiedzią poszczepienną – jeśli by zostało to potwierdzone w dalszych badaniach – mogłoby to mieć istotne znaczenie z punktu widzenia zdrowia publicznego (zwłaszcza w kontekście okresu grypowego czy pandemii wirusów atakujących układ oddechowy) [23].



7. Podsumowanie

Elektroniczne papierosy wpływają m.in. na skład flory bakteryjnej jelit: obserwowano zmiany profilu bakterii w mikrobiomie jelitowym pod wpływem działania ich oparów. Ilość niektórych bakterii (np. *Prevotella*) jest podwyższona, a innych (np. *Bacteroides*) zmniejszona – w porównaniu z ich zawartością u osób niepalących. W badaniu doświadczalnym wykazano wpływ oparów elektronicznych papierosów na produkcję mucyny, MMP, osłabienie ochrony antyoksydacyjnej i na indukcję procesu zapalnego w okrężnicy. W różnych modelach doświadczalnych wykazano również toksyczne oddziaływanie ekstraktu aerozolowego e-papierosów na makrofagi płęcherzykowe, a także na komórki nabłonka jamy ustnej i płuc; pod wpływem aerozolu następował wzrost produkcji rodników tlenowych, spadek produkcji antyoksydantów enzymatycznych oraz wzrost produkcji zapalnych cytokin i chemokin. Składniki płynu zawartego w e-papierosach upośledzają funkcjonowanie mechanizmów odporności wrodzonej i nabytej, w tym między innymi osłabiają aktywność fagocytarną, chemotaksję neutrofilów oraz obniżają produkcję reaktywnych form tlenu ważnych dla mechanizmów obronnych. To może przekładać się na zwiększoną podatność na infekcje bakteryjne i wirusowe w pierwotnych komórkach dróg oddechowych. Sprzyjają temu zmiany w ekspresji cytokin ze spadkiem stężenia cytokin ważnych w odporności przeciwwirusowej. Używanie papierosów osłabia również immunologiczną odpowiedź poszczepienną. Zarówno u palaczy papierosów tradycyjnych, jak też palaczy e-papierosów nie obserwuje się oczekiwanego wzrostu przeciwciał przeciwko żywym atenuowanym wirusom grypy w klasie IgA (ang. *antibody-LAIV IgA*, *anty-LAIV IgA*) w płynie nabłonkowym nosa w odpowiedzi na żywą atenuowaną szczepionkę przeciwko wirusowi LAIV (wirus grypy). Wśród osób ze wspomnianych dwóch grup (szczególnie u palaczy e-papierosów) dochodzi do niekorzystnej ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w odpowiedzi przeciwwirusowej. Okazuje się zatem, że e-papierosy wywierają wpływ na układ odpornościowy, ryzyko infekcji i odpowiedź poszczepienną.

8. Wnioski

Biorąc pod uwagę popularność używania elektronicznych papierosów oraz powszechnie pojawiające się stwierdzenie jakoby było one bezpieczniejsze od palenia tytoniu zawartego w papierosach tradycyjnych i mając na uwagę przytaczane wyżej badania wskazujące na możliwy wpływ produktów do wapowania, należy rozważyć szersze badania nad bezpieczeństwem, nad mechanizmami immunologicznymi, na które wpływają i wreszcie nad samym ich składem. Takie badania ukierunkowane na krótko- i długotrwałe skutki związane z używaniem e-papierosów mogłyby poszerzyć dotychczasową wiedzę w tym zakresie, a to mogłoby mieć znaczący wpływ na poprawę bezpieczeństwa użytkowników, a przynajmniej na zwiększenie świadomości dotyczącej możliwych skutków niepożądanych.

Literatura

1. Rom O., Pecorelli A., Valacchi G., Reznick A.Z., *Are E-cigarettes a safe and good alternative to cigarette smoking?*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2015, s. 65-74.
2. DeVito E.E., Krishnan-Sarin S., *E-cigarettes: Impact of E-Liquid Components and Device Characteristics on Nicotine Exposure*, *Current Neuropharmacology*, 2018, s. 438-459.

3. <http://isap.sejm.gov.pl/isap.nsf/DocDetails.xsp?id=WDU20160001331> [dostęp: 06.03.2022].
4. Zulfiqar H., Rahman O., *Vaping Associated Pulmonary Injury*, StatPearls Publishing, 2022.
5. Brandon T.H., Goniewicz M.L., Hanna N.H., Hatsukami D.K., Herbst R.S., Hobin J.A., Ostroff J.S., Shields P.G., Toll B.A., Tyne C.A., Viswanath K., Warren G.W., *Electronic nicotine delivery systems: a policy statement from the American Association for Cancer Research and the American Society of Clinical Oncology*, Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 2015, s. 514-525.
6. <https://pl.smoko.com/blogi/po-co-u%C5%BCywa%C4%87-e-papierosa/przewodnik-vaper%C3%B3w-na-temat-r%C3%B3w%C5%BCnych-rodzaj%C3%B3w-e-papieros%C3%B3w> [data dostępu: 06.03.2022]
7. <https://brpd.gov.pl/2020/12/28/alarmujace-wyniki-badan-e-papierosy-staly-sie-nalogiem-mlodziezy/> [data dostępu: 22.02.2022]
8. Gałęcka M., Basińska A. B., Bartnicka A., *Znaczenie mikrobioty jelitowej w kształtowaniu zdrowia człowieka – implikacje w praktyce lekarza rodzinnego*, Medycyna Praktyczna, 2018, s. 50-59.
9. Martinez J.E., Kahana D.D., Ghuman S., Wilson H.P., Wilson J., Kim S., Lagishetty, V., Jacobs J.P., Sinha-Hikim A.P., Friedman T.C., *Unhealthy Lifestyle and Gut Dysbiosis: A Better Understanding of the Effects of Poor Diet and Nicotine on the Intestinal Microbiome*, Frontiers in Endocrinology, 2021.
10. Mohammed H.O., Ahmed Alaa El-Din E., Farag A.I., *Impact of e-cigarettes on colonic mucosa and the role of recovery: involvement of oxidative and inflammatory pathway*, Environmental Science and Pollution Research International, 2021.
11. Scott A., Lugg S.T., Aldridge K., Lewis K.E., Bowden A., Mahida R.Y., Grudzinska F.S., Dosanjh D., Parekh D., Foronjy R., Sapay E., Naidu B., Thickett D.R., *Pro-inflammatory effects of e-cigarette vapour condensate on human alveolar macrophages*, Thorax, 2018, s. 1161-1169.
12. Ghosh A., Coakley R.D., Ghio A.J., Muhlebach M.S., Esther C.R.Jr, Alexis N.E., Tarran R., *Chronic E-Cigarette Use Increases Neutrophil Elastase and Matrix Metalloprotease Levels in the Lung*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2019, s. 1392-1401.
13. Reidel B., Radicioni G., Clapp P.W., Ford A.A., Abdelwahab S., Rebuli M.E., Haridass P., Alexis N.E., Jaspers I., Kesimer M., *E-Cigarette Use Causes a Unique Innate Immune Response in the Lung, Involving Increased Neutrophilic Activation and Altered Mucin Secretion*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2018, s. 492-501.
14. Sayed I.M., Masso-Silva J.A., Mittal A., Patel A., Lin E., Moshensky A., Shin J., Bojanowski C.M., Das S., Akuthota P., Crotty Alexander L.E., *Inflammatory phenotype modulation in the respiratory tract and systemic circulation of e-cigarette users: a pilot study*, American journal of physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, 2021, s. 1134-1146.
15. Ganapathy V., Manyanga J., Brame L., McGuire D., Sadhasivam B., Floyd E., Rubenstein D.A., Ramachandran I., Wagener T., Queimado L., *Electronic cigarette aerosols suppress cellular antioxidant defenses and induce significant oxidative DNA damage*, PloS one, 2017.
16. Poulianiti K., Karatzaferi C., Flouris A. D., Fatouros I.G., Koutedakis Y., Jamurtas A.Z., *Antioxidant responses following active and passive smoking of tobacco and electronic cigarettes*, Toxicology mechanisms and methods, 2016, s. 455-461.
17. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T., *Immunologia*, PWN, Warszawa 2017, s. 235.
18. Higham A., Rattray N.J., Dewhurst J.A., Trivedi D.K., Fowler S.J., Goodacre R., Singh D., *Electronic cigarette exposure triggers neutrophil inflammatory responses*, Respiratory Research, 2016.



19. de Bont C.M., Boelens W.C., Pruijn G., *NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship*, Cellular & Molecular Immunology, 2019, s. 19-27.
20. Jasper A.E., Sapely E., Thickett D.R., Scott A., *Understanding potential mechanisms of harm: the drivers of electronic cigarette-induced changes in alveolarmacrophages, neutrophils, and lung epithelial cells*, American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, 2021, s. 336-348.
21. Tan K.S., Wang Y., *Vaping and Respiratory Viruses: The End for ENDS?* American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2021, 16–18.
22. Langel S.N., Kelly F.L., Brass D.M., Nagler A.E., Carmack D., Tu J.J., Travieso T., Goswami R., Permar S.R., Blasi M., Palmer S.M., *E-cigarette and food flavoring diacetyl alters airway cell morphology, inflammatory and antiviral response, and susceptibility to SARS-CoV-2*, Cell Death Discovery, 2022.
23. Rebuli M.E., Glista-Baker E., Hoffman J.R., Duffney P.F., Robinette C., Speen A.M., Pawlak E.A., Dhingra R., Noah T.L., Jaspers I., *Electronic-Cigarette Use Alters Nasal Mucosal Immune Response to Live-attenuated Influenza Virus. A Clinical Trial*, American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2021, s. 126-137.

E – papierosy – wpływ na układ odpornościowy, ryzyko infekcji i odpowiedź poszczepienna

Streszczenie

Elektroniczne papierosy (czyli tzw. e-papierosy) zostały opracowane w 2003 roku. W ostatnich latach wzrasta zainteresowanie tymi urządzeniami – szacuje się, że używa ich od 7 do 12% osób dorosłych i do 37% nastolatków.

Wiele osób używających e-papierosy jest przeświadczonej o ich niewielkiej szkodliwości. Wyniki badań wskazują jednak, że substancje chemiczne, używane jako baza dla wszystkich płynów, stosowanych w e-papierosach beznikotynowych, w tym glikol propylenowy i gliceryna roślinna, wywierają szereg negatywnych konsekwencji dla zdrowia. Wykazano m.in., że substancje te naruszają barierę jelitową i przyczyniają się do rozwoju stanu zapalnego w organizmie.

Najnowsze badania wskazują, że e-papierosy negatywnie wpływają na funkcje układu odpornościowego. W badaniach doświadczalnych i klinicznych udowodniono, że substancje zawarte w e-papierosach zmieniają profil białek, uczestniczących w mechanizmach obronnych w wydzielinie dróg oddechowych. Dotyczy to m.in. białek związanych z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc (elastaza, metaloproteinaza macierzy pozakomórkowej-9), białek biorących udział w ochronie antyoksydacyjnej, a także związanych z funkcją neutrofilii: mieloperoksydazy, azurocidyny i deiminazy białkowo-argininowej 4. Wykazano zmiany w cytoszkieletcie neutrofilów niekorzystnie wpływające na ich zdolność do migracji oraz spadek wytwarzania tzw. zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NETs) stanowiących jedną z pierwszych linii obrony organizmu przed czynnikami infekcyjnymi. Odnotowano także spadek aktywności fagocytarnej neutrofilii oraz spadek produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), ważnych w obronie przeciw patogenom.

W badaniach doświadczalnych i klinicznych wykazano, że ekspozycja na substancje uwalniane z e-papierosów, zwiększa podatność na infekcje wirusowe i bakteryjne, w szczególności na zakażenia bakteriami Gram-ujemnymi, oraz nasila rozwój bakterii, negatywnie wpływa na przebieg infekcji oraz na wytworzenie odporności poszczepiennej. U użytkowników e-papierosów zaobserwowano brak wzrostu poziomu IgA w wyściółce nabłonka nosa po podaniu atenuowanej szczepionki przeciw grypie do stosowania donosowego; odnotowano również niekorzystne zmiany w ekspresji wielu genów kodujących białka uczestniczące w procesach odpornościowych ważnych w obronie przeciwwirusowej i powstawaniu pamięci immunologicznej. Słowa kluczowe: e-papierosy, immunologia, NEToza

E-cigarettes – effects on the immune system, risk of infection and vaccine response

Abstract

Electronic cigarettes (i.e. e-cigarettes) were developed in 2003. In recent years, interest in these devices has increased – it is estimated that they are used by 7-12% of adults and up to 37% of teenagers.

Many people who use e-cigarettes are convinced that they are not harmful. However, research results indicate that the chemicals used as a base for all liquids used in nicotine-free e-cigarettes, including

propylene glycol and plant glycerin, have a number of negative health consequences. It has been shown, for example, that these substances disrupt the intestinal barrier and contribute to the development of inflammation in the body.

Recent research shows that e-cigarettes negatively affect the functions of the immune system. It has been proved in experimental and clinical studies that the substances contained in e-cigarettes change the profile of proteins involved in defense mechanisms in the secretions of the respiratory tract. This applies, inter alia, to Proteins associated with chronic obstructive pulmonary disease (elastase, matrix metalloproteinase-9), proteins involved in antioxidant protection, and also related to the function of neutrophils: myeloperoxidase, azurocidin and protein-arginine deiminase 4. Changes in the cytoskeleton of neutrophils have been shown to adversely affect their neutrophils the ability to migrate and a decrease in the production of the so-called extracellular neutrophil traps (NETs), which are one of the body's first lines of defense against infectious agents. There was also a decrease in the phagocytic activity of neutrophils and a decrease in the production of reactive oxygen species (ROS), important in defense against pathogens.

It has been shown in experimental and clinical studies that exposure to substances released from e-cigarettes increases susceptibility to viral and bacterial infections, in particular to gram-negative bacterial infections, and increases the growth of bacteria, negatively affects the course of infection and the development of immunity to vaccination. Among the users of e-cigarettes, no increase in IgA levels in the lining of the nasal epithelium following administration of an attenuated influenza vaccine for intranasal use; Adverse changes in the expression of many genes encoding proteins involved in immune processes important in antiviral defense and the formation of immune memory have also been reported.

Keywords: e-cigarette, immunology, NETosis

Indeks Autorów

Bendykowska M.	144	Mędrak E.	137, 144
Błażkowska D.	44	Nieciecka D.	101
Borecka P.	44	Ostrowska M.	124
Brzozowska N.	144	Ostrowski B.	66
Chodkowski M.	54	Pajor D.	163
Czarnecka A.	44	Patrycy M.	54
Czarnul K.	44	Piłat P.	7, 113
Fiolka R.	18	Stefańska A.	152
Głowacka A.	26	Surtel A.	76
Gospodarczyk A.	18	Suwara J.	87
Gromadzka G.	137, 170	Szkodny D.	18
Jakubiak G.K.	7, 113	Szpila G.	7, 113
Jałonica E.	170	Ścisłowska U.	170
Janicka M.	54	Vogt A.	124
Kiernicka M.	76	Wylaż M.W.	163
Koseska K.	137	Wylęgała E.	18
Krawczyk B.	66	Wysokińska-Miszcuk J.	76
Krzyżowska M.	54	Zegarska P.	137, 144
Kubacka J.	152		

